



HAL
open science

Développement d'outils “ biocapteurs/modèle cellulaire ” pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines

Alexandre Berthier

► **To cite this version:**

Alexandre Berthier. Développement d'outils “ biocapteurs/modèle cellulaire ” pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Franche-Comté, 2008. Français. NNT: . tel-00404562

HAL Id: tel-00404562

<https://theses.hal.science/tel-00404562v1>

Submitted on 16 Jul 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES

**Doctorat de l'Université de Franche-Comté
Sciences de la Vie et de la Santé**

Développement d'outils « biocapteurs/modèle cellulaire » pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines

THESE

Soutenue le 18 décembre 2008

Par

Alexandre BERTHIER

Né le 4 août 1981 à Belfort (90)

Membres de jury :

▪ **Rapporteurs :**

M. Michael Canva Directeur de recherches, CNRS-UMR 8501 Université Paris-Sud
M. Benoit Roig Maître de conférences, HDR Ecole des Mines d'Alès

▪ **Examineurs :**

M. Pierre Tiberghien Professeur Université de Franche-Comté / IFR 133
M. Philippe Picart Professeur Université de Franche-Comté / FEMTO-ST

▪ **Directeur de thèse :**

M. Régis Delage-Mourroux Professeur Université de Franche-Comté / IFR 133

▪ **Codirecteur de thèse :**

M. Wilfrid Boireau Chargé de recherches, CNRS-UMR 6174 FEMTO-ST

A mon fils,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury.

Je suis très sensible à l'honneur que me font messieurs **Michael Canva** et **Benoit Roig** en acceptant de juger ce travail. Je suis touché de voir en leur présence un gage de qualité.

Je tiens aussi à remercier messieurs **Pierre Tiberghien** et **Philippe Picart** d'avoir accepté de participer à ce jury. L'intérêt que vous portez à mon travail me touche particulièrement.

Au moment où cette thèse s'achève, je me rends compte du grand nombre de personnes qui m'a soutenu au cours de ces dernières années. Ainsi, j'aimerais ici toutes les remercier, en espérant n'oublier personne...

Je tenais avant tout à remercier le tandem de choc qui a encadré ce travail : **Régis Delage-Mourroux** et **Wilfrid Boireau**. « Plus que des directeurs de thèse pour moi, vous êtes devenus des amis... »

« Régis, tu m'as donné le goût de la recherche. C'est à partir de la licence que nos routes se sont croisées et que tu as su me transmettre cette passion... Tu as été un véritable guide lors de ces quatre dernières années, surtout dans les moments les plus difficiles. Tu m'as soutenu lorsque j'en avais besoin, tu m'as encouragé et remonté le moral dans les moments les plus durs. Je ne serais jamais arrivé jusque là sans toi... »

« Wilfrid, tu m'as fait découvrir le monde des nanosciences. Tu as toi aussi été un guide dans cet univers bien particulier. Je tenais à te remercier pour le temps que tu as su trouver pour m'aider à mieux surmonter les nombreux obstacles qui ont jalonné mon chemin. Je voulais aussi te remercier pour la convivialité que tu as créée au sein de notre équipe qui naquit pendant cette thèse. L'ambiance du labo ainsi que nos petites sorties CLIPP vont me manquer... »

Je tenais aussi à remercier tout particulièrement **Michèle Jouvenot** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

« Michèle, la passion qui t'anime me laisse sans voix. Je tenais à te remercier pour tous tes précieux conseils, ainsi que pour le temps que tu m'as consacré, malgré un emploi du temps plus que chargé. »

Merci à **Annick** et **Pascale** qui m'ont prodigué de précieux conseils et qui m'ont permis de mener à bien mon travail.

Je ne peux oublier mes collègues de la « gec1 team » : **Fabrice**, **Stéphanie** et **Virginie**.

« Fab, j'ai énormément appris avec toi. Ton départ vers de nouveaux horizons a laissé un grand vide, même si je sais que nous garderons toujours contact. Les petites sessions bricolage n'étaient plus pareilles sans toi... »

« Stéphanie, ma chère « pouasse-woman » je suis heureux de t'avoir rencontrée et d'avoir travaillé avec toi. Je voulais te remercier d'avoir accepté de relire ma thèse, afin d'y relever les dernières coquilles. J'espère que la chance te sourira pour la fin de ta thèse. Bon courage, je suis sûr que tu y arriveras... »

Je tenais à remercier aussi tous mes compagnons de route **Karine**, **Sophie**, **Nicolas**, **Fatima**, **Kevin**, **Elise** et **Romain**.

« Bonne chance à tous ceux et celles qui soutiendront bientôt leurs thèses. Bon courage à ceux qui la débute, profitez bien de cette expérience enrichissante, vous serez bientôt à ma place... Enfin, à ceux qui sont encore sur les bancs de la fac, je vous souhaite d'atteindre vos objectifs, le plus sereinement possible. »

Un grand merci à notre « wonder-technicienne », **Valérie**.

« Valérie, encore merci pour toute la précieuse aide que tu m'as apporté. Tu es la clé de voûte de ce labo... Ne laisse jamais quelqu'un te dire le contraire ! »

Je remercie également tous les membres de l'équipe E₂SNC : **Jean, Maï, Michael, Martine, Pierre-Yves, Martine, Gabrielle, Fabrice, Claude J., Christophe, Claude C. et Annie.**

Je tenais à remercier les gens de CLIPP et en particulier **Céline, Alain et Benoît.**

« Merci à vous trois pour l'aide et le soutien que vous m'avez apportés depuis que nos chemins se sont croisés.

Céline, j'ai vraiment apprécié de t'avoir rencontrée et d'avoir travaillé avec toi. Tu m'as fait découvrir un drôle d'appareil : le microscope à force atomique (un nom très impressionnant pour un si petit appareil !) Tu as souvent été là pour me remonter le moral, alors encore merci.

Alain, nos petites discussions accoudés à la paillasse ou au comptoir vont me manquer. Qui sait, peut être qu'un jour tu seras à ma place...

Benoît, tu n'es arrivé que tardivement (là, je ne parle pas de tes heures d'arrivée au labo !) mais j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Tous mes voeux de réussite pour la suite... »

J'aimerais aussi remercier mes collègues moniteurs et monitrices : **Jean-Sébastien, Guillaume, Marie-Laure et Emilie** ; ainsi que celles que je n'ai pas encore cité et avec qui j'ai découvert la dure réalité de l'organisation du forum des jeunes chercheurs : **Carole et Adeline.**

Je remercie également mes proches et mes amis : **Stéphanie, Pierre, Charlotte** (mon adorable petite nièce), **Claude, Dominique, Marine, Gouille, Faust, Ceix, Estelle, Malp, Julien, Corinne, Docky** et tous les autres **sanins** et **sanines**....

« Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenu et de m'avoir permis de faire un « break » quand j'en avais besoin. »

Je remercie tout particulièrement mes parents sans qui je ne serais jamais arrivé jusque là.

« **Papa, Maman**, je vous remercie du plus profond de mon cœur de m'avoir permis de découvrir le passionnant métier de chercheur. Merci pour votre soutien tout au long de mon parcours scolaire et universitaire. Je vous remercie aussi de m'avoir appris à ne pas renoncer, même si parfois le message avait du mal à rentrer dans ma petite tête... Vous êtes les meilleurs parents du monde et je suis fier d'être votre fils ! »

Enfin je tenais à remercier celle qui a dû me supporter pendant cette épreuve, ma chérie **Coralie**.

« Tu as été là à chaque instant, partageant avec moi les bons comme les mauvais moments et je t'en remercie. Dès l'instant où j'ai croisé ton regard j'ai su que nous étions faits l'un pour l'autre. C'est vrai que les débuts de notre relation n'ont pas vraiment été simples, mais j'ai toujours cru en notre amour. Merci de m'avoir toujours soutenu et apaisé durant ces années. Et surtout, merci pour le plus merveilleux de tous les cadeaux que tu vas m'offrir dans quelques jours : un fils. Tu es et tu resteras toujours mon petit rayon de soleil. **JE T'AIME !** »

Enfin je tenais à dédier cette thèse à **mon fils**.

« A l'heure où j'écris ses quelques lignes, tu n'es pas encore parmi nous. Ta mère et moi n'avons toujours pas pris notre décision quant au prénom que nous allions te donner, mais tu es déjà au centre de toutes nos pensées. Même si je ne cesse de répéter à ta mère qu'il ne faut pas que tu arrives avant que j'ai rendu ce manuscrit, je suis impatient de faire ta connaissance et de te prendre dans mes bras... »

PRÉAMBULE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe « **Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central (E₂SNC)**; IFR 133 Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire (IBCT) » et la plateforme protéomique « **CLinical & Innovation Proteomic Platform (CLIPP)** » ; département Micro Nano Sciences & Systèmes (MN2S) ; Institut Franche-Comté Electronique Mécanique Thermique et Optique - Sciences et Technologies (FEMTO-ST) et IFR 100 (Dijon) ».

L'objectif général de mes travaux a consisté à développer des outils permettant l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines. Pour ce faire, j'ai développé un **modèle cellulaire** ainsi que deux **biocapteurs SPR** (Résonance Plasmonique de Surface) nommés **prototype « lipidique »** et **prototype « C11/C16 »**. Ce dernier étant compatible avec l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines. Ces modèles ont été utilisés pour identifier des molécules estrogéniques et de partenaires de la protéine GEC1.

Les xénoestrogènes sont des molécules capables de moduler l'expression génique *via* l'interaction spécifique des récepteurs aux estrogènes (RE) avec une séquence ADN au voisinage d'un gène cible. L'interaction de ces récepteurs avec l'ADN est donc une étape indispensable à l'activité estrogénique. Cependant, afin de transactiver un gène, ces derniers doivent recruter les différents acteurs de la machinerie transcriptionnelle. Ainsi, l'utilisation d'un biocapteur ADN/protéine permet un précriblage de molécules afin de ne retenir que celles capable de moduler l'interaction du RE avec sa cible nucléotidique. La détermination de la nature agoniste ou antagoniste des molécules sélectionnées nécessite quant à elle, l'utilisation d'un contexte biologique plus complexe possédant tous les acteurs de la transcription (co-activateur, co-répresseurs et facteurs généraux de la transcription). J'ai donc développé, en parallèle, un modèle cellulaire permettant la caractérisation des molécules préselectionnées.

Enfin, afin de prouver que le prototype « C11/C16 » permettait l'étude des interactions protéines/protéines, j'ai choisi comme application biologique l'identification de partenaires protéiques de GEC1. Cette protéine étant codée par un gène estrogénodépendant.

Ce manuscrit s'articule en six parties, dont la première intitulée « **contexte bibliographique** » présente les connaissances actuelles dans les domaines de la régulation génique par les estrogènes et des biocapteurs SPR. La seconde partie intitulée « **cadre et but du travail** » présente les stratégies mises en place lors de mes travaux ainsi que leurs intérêts. La partie « **matériel et méthodes** » regroupe l'ensemble des techniques utilisées pour mener à bien ce projet. La partie « **résultats** » regroupe l'ensemble de mes résultats obtenus en réponse à mes objectifs :

1) Mise au point de biocapteurs ADN/protéine

- Le prototype « lipidique » dont la conception et la caractérisation sont présentées dans la publication numéro I :

“Nanobioengineering and Characterization of a Novel Estrogen Receptor Biosensor”.

Alexandre Berthier, Céline Elie-Caille, Eric Lesniewska, Régis Delage-Mourroux et Wilfrid Boireau. *Sensors*, 2008 ; vol 8 : 4413-4428

- Le prototype « C11/C16 » qui a permis le précriblage de molécules comme la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin.

2) La mise au point d'un modèle cellulaire MCF-7 qui a permis l'identification d'un nouveau phytoestrogène : la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin. Les résultats de cette approche font l'objet de la publication numéro II :

“Effect of 7-O- β -D-Glucopyranosylchrysin and its Aglycone Chrysin Isolated from *Podocytisus caramanicus* on Estrogen Receptor a Transcriptional Activity.” **Alexandre Berthier**, Corinne Girard, Aurélie Grandvullemin, Frédéric Muyard, Alexios-Leandros Skaltsounis, Michèle Jouvenot et Régis Delage-Mourroux. *Planta Medica*, 2007 ; vol 73 (14) : 1447-1551

- 3) La mise au point d'un biocapteur protéines/protéines, basé sur le prototype « C11/C16 », ayant permis l'identification de l'homodimérisation de GEC1.

La cinquième partie intitulée « **conclusion-discussion** » reprend l'ensemble des résultats en les replaçant dans le contexte bibliographique. Enfin, la sixième et dernière partie intitulée « **perspectives** » permet d'entrevoir la poursuite de ces travaux, ainsi que les nouvelles applications envisagées.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
PREAMBULE	8
SOMMAIRE	12
ABREVIATIONS	15
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	20
1. REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR LES ESTROGENES	21
1.1. GENERALITES	21
1.2. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES AUX ESTROGENES	21
1.2.1 Structures et fonctions des récepteurs nucléaires	21
1.2.2 Les récepteurs aux estrogènes de types α et β	24
1.2.2.1 Organisation génique	24
1.2.2.2 Structures protéiques	25
1.2.3 Actions génomiques des RE	28
1.2.3.1 Actions génomiques directes	28
1.2.3.2 Actions génomiques indirectes	30
1.2.4 Autres voies d'action des RE	32
1.2.4.1 Voie d'action indépendante du ligand	32
1.2.4.2 Voie d'action non génomique : les RE membranaires	33
1.3. LES LIGANDS DES RECEPTEURS AUX ESTROGENES	34
1.3.1 Les estrogènes physiologiques	34
1.3.2 Les xénoestrogènes	36
1.3.2.1 Les molécules d'origine naturelle	36
1.3.2.2 Les molécules d'origine synthétique	40
1.3.2.2.1 Molécules à usage thérapeutique	40
1.3.2.2.2 Les perturbateurs endocriniens	43
2. GENES REGULES PAR LES ESTROGENES	45
2.1. MECANISME DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	45
2.2. DIFFERENTS GENES CIBLES	47
2.3. DIFFERENTS ELEMENTS DE REPOSE AUX ESTROGENES	48
2.4. EXEMPLE DE GENE REGULE PAR LES ESTROGENES : GEC1	49
3. MODELES D'ETUDES DES INTERACTIONS ADN/PROTEINE ET PROTEINES/PROTEINES	53
3.1. LES MODELES CELLULAIRES	53
3.1.1 Criblage de xénoestrogènes	53
3.1.2 Identification de partenaires protéiques	54
3.2. LES BIOCAPTEURS	54
3.2.1 La résonance plasmonique de surface (SPR)	55
3.2.2 Exemples d'application	57
3.2.3 Différentes surfaces de puce	58
3.2.3.1 Les surfaces tridimensionnelles (Dextran)	59
3.2.3.1.1 Description	59
3.2.3.1.2 Avantages et inconvénients	60
3.2.3.2 Les surfaces bidimensionnelles	61

3.2.3.2.1	Description	61
3.2.3.2.2	Avantages et inconvénients	64
3.2.4	Les capteurs ADN/protéine	65
3.2.5	Les capteurs protéines/protéines	67

CADRE ET BUT DU TRAVAIL **69**

MATERIELS ET METHODES **76**

1.	MATERIELS	77
1.1.	LES COMPOSES ETUDIES	77
1.1.1	Les composés d'origine synthétique	77
1.1.2	Les composés d'origine naturelle	77
1.2.	LES CONSTITUANTS DES DIFFERENTS BIOCAPTEURS	78
1.2.1	Les biocapteurs ADN / protéines	78
1.2.1.1	Prototype « lipidique »	78
1.2.1.2	Le prototype « C11 / C16 »	79
1.3.	LA LIGNEE CELLULAIRE MCF-7	80
1.4.	LES VECTEURS	80
1.4.1	Vecteur 2ERE-pS2-Luc	80
1.4.2	Vecteur pSV β -Gal	81
1.4.3	Vecteurs pGEX4T2	81
1.4.4	Vecteur pSBET -FLAG-GEC1-(His) ₆	82
2.	AMPLIFICATION, PURIFICATION ET SEQUENÇAGE DES VECTEURS	82
2.1.	TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES	82
2.2.	EXTRACTION DES ADN PLASMIDIQUES	83
2.2.1	Mini-préparation par lyse alcaline	83
2.2.2	Maxi-préparation	83
2.3.	SEQUENÇAGE DES VECTEURS	83
3.	CULTURE CELLULAIRE	83
3.1.	MILIEUX DE CULTURE	83
3.2.	PASSAGE DES CELLULES	84
3.3.	CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES	84
3.4.	TRANSFECTION CELLULAIRE TRANSITOIRE	85
4.	ANALYSE, EXPRESSION ET PURIFICATION DE PROTEINES	85
4.1.	DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES LUCIFERASE ET β -GALACTOSIDASE	85
4.2.	ANALYSE BIOCHIMIQUE DES PROTEINES D'INTERET	86
4.2.1	Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate –PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	86
4.2.2	Western blotting	86
4.3.	PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES	87
4.3.1	Protéines GST, GST-GEC1 et GST-GABARAP	87
4.3.2	Protéine FLAG-GEC1-(His) ₆	88
4.4.	GST PULL-DOWN	88
5.	ASSEMBLAGE DES BIOCAPTEURS	89
5.1.	LES BIOCAPTEURS ADN/PROTEINE	89
5.1.1	Prototype « lipidique »	89
5.1.1.1	Spécificité	89
5.1.1.2	Couplage des oligonucléotides au cytochrome b5 modifié	90
5.1.1.3	Formation des hybrides d'intérêt : (P-DNA) ₂	92
5.1.1.4	Assemblage du biocapteur	92
5.1.1.5	Etude de l'interaction du RE avec l'ADN	93
5.1.1.6	Microscopie à force atomique (AFM)	94
5.1.2	Prototype « C11/C16 »	94

5.1.2.1	Spécificité	94
5.1.2.2	Assemblage du biocapteur	95
5.1.2.3	Criblage de composés	96
5.2.	BIOCAPTEUR PROTEINES/PROTEINES	96
5.2.1	Spécificité	96
5.2.2	Assemblage du biocapteur	97
5.2.3	Confrontation de partenaires potentiels	97

RESULTATS **98**

1.	MISE AU POINT DES BIOCAPTEURS ADN/PROTEINE	99
1.1.	LE PROTOTYPE « LIPIDIQUE »	99
1.1.1	Conception et caractérisation du biocapteur	99
1.1.2	Problèmes rencontrés.	122
1.2.	LE PROTOTYPE « C11/C16 »	124
1.2.1	Assemblage du biocapteur	124
1.2.2	Validation du biocapteur	125
1.2.3	Criblage de composés	126
2.	NOUVEAUX PHYTOESTROGENES : LA CHRYSINE ET SON GLUCOPYRANOSIDE	128
3.	BIOCAPTEUR PROTEINES/PROTEINES : IDENTIFICATION DE PARTENAIRES DE LA PROTEINE GEC1	135
3.1.	GENERALITES ET OBJECTIFS	135
3.2.	BIOCAPTEUR PROTEINES/PROTEINES	135
3.2.1	Production et purification pSBET-FLAG-GEC1-(His) ₆	135
3.2.2	Assemblage du biocapteur	136
3.2.3	Validation du biocapteur	137
3.2.4	Etude des interactions	138
3.3.	CONFIRMATION DES RESULTATS SPR PAR GST PULL-DOWN	139

DISCUSSION – CONCLUSIONS **140**

1.	DEVELOPPEMENT DES BIOCAPTEURS RE/ERE	141
1.1.	MAITRISE DE L'ARCHITECTURE	142
1.2.	PERFORMANCE DES BIOCAPTEURS RE/ERE	144
2.	IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU PHYTOESTROGENE	148
3.	HOMODIMERISATION DE GEC1	149

PERSPECTIVES **151**

BIBLIOGRAPHIE **154**

ANNEXES **179**

1.	PUBLICATION NUMERO III :	180
2.	LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES	199
3.	LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHE	199

ABREVIATIONS

17-HSD : 17- β -HydroxyStéroïde Déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AF : Activation Function

AFM : Atomic Force Microscopy

AIB1 : Amplified In Breast cancer-1

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARH : Autosomal Recessive Hypercholesterolemia

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BPA : BisPhénol A

CBP : Cyclic AMP responsive element binding protein Binding Protein

CMD : CarboxyMéthyl-Dextran

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRE : cAMP Response Element

CHOP : Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone

CTAB : Bromure d'hexadécyltriméthylammonium

DBD : DNA Binding Domain (domaine de liaison à l'ADN)

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DDX47 : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) boX polypeptide 47

DES : DiEthylStilbestrol

DHAS : DeHydroepiAndrostérone Sulfate

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMPC : Dimyrisoyl Phosphatidyl Choline

DMSO : Diméthyl SulfOxyde

DNase : DésoxyriboNucléase

DOGS : 1,2-DiOleoyl-sn-Glycero-3[(N (5-amino-1-carboxypentyl) imminodiacetic acid) Sycceinyl]

DTT : DiThioThréitol

E₁ : Estrone

E₂ : Estradiol-17 β

E₃ : Estriol

EBAG9 : Estrogen receptor-Binding fragment-Associated Gene 9

EDC : 1-Ethyl-3- (3- Diméthylaminopropyl) Carbodiimide

EDTA : Etylen Diamine Tetra-acetic Acid

EGF : Epidermal Growth Factor

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

ERAP140 : ER Associated Protein 140

ERE : Element de Réponse aux Estrogènes

ESR1 et 2 : EStrogen Receptor 1 et 2

GABA : Gamma-AminoButyric Acid

GABARAP : GABA_A Receptor Associated Protein

GEC : Glandular Epithelial Cells

GEC1 : Glandular Epithelial Cell protein 1

GRIP1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1

GPR30 : G Protein-coupled Receptor-like

GST : Glutathion-S-Transferase

HBS-EP : Hepes Buffer Saline EDTA P20

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute pression)

HRE : Élément de Réponse à l'Hormone

HRP : Horseradish Peroxydase

HS-C₁₁-OH : 11-mercapto-1-undécanol

HS-C₁₅-COOH : acide 16-mercaptohexadécanoïque

HSP : Heat Shock Protein

IDA : Iminodiacetic acid

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IL : Interleukine

INF γ : Interféron γ

IPTG : IsoPropyl- β -D-Thio-Galactopyranoside

kpb : Kilo Paire de Bases

LB : Luria Bertani

LBD : Ligand Binding Domain (Domaine de liaison du ligand)

LC-SPDP : Succinimidyl 6-[3'-(2-PyridylDithio)-Propionamido] hexanoate

LDL : Low-Density Lipoprotein

MAPK : Microtubule Associated Protein Kinase

MC : Milieu Complet

MCDS : Milieu Complet DéStéroïdé

MS : Milieu de Stimulation

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NHS : N-HydroxySuccinimide

NLS : Nuclear Localisation Sequence (séquence de localisation nucléaire)

NMDA : N-Methyl-D-Aspartic acid

NSF : N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein

OG : Octyl Glucopyranoside

OM : Octadécyl Mercaptan

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl- β -D-Galactopyranoside

pb : Paires de Bases

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCB : PolyChloroBiphényles

PEI : PolyEthylenImine

PEG : PolyEthylène Glycol

PEO : PolyEthylène Oxide

PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase

PPAR : Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors

PRIP1 : Phospholipase C-Related Inactive Protein 1

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

QCM : Quartz Crystal Microbalance

RE : Récepteur aux Estrogènes

RN : Récepteur Nucléaire

SAM : Self Assembled Monolayer (monocouche auto assemblée)

SAW : Surface Acoustic Wave

SDS : Sodium DodecylSulfate

SDS-PAGE : Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator

Sp1 : Specific Promoter transcription factor 1

SPR : Surface Plasmon Resonance

SRC : Steroid Receptor Coactivator

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBS : Tris Buffer Saline

TFF1 : TreFoil Factor 1

TGF : Transforming Growth Factor

THS : Traitement Hormonal Substitutif

TNF : Tumor Necrosis Factor

ULK1 : Unk51-Like Kinase

UTR : UnTranslated Region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

ZEA : ZEAralenone

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Régulation de l'expression génique par les estrogènes

1.1. Généralités

Les estrogènes et en particulier l'estradiol-17 β (E₂) contribuent au contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires et aussi de l'apoptose. Pour ce faire, ces molécules doivent interagir avec les Récepteurs aux Estrogènes (RE). Ceux-ci appartiennent à deux grandes catégories distinctes, à savoir, la superfamille des Récepteurs Nucléaires (RN) et les récepteurs membranaires. Lors de nos travaux, nous avons focalisé notre attention sur les RE nucléaires. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription capables de se fixer sur une séquence cis-régulatrice appelée Elément de Réponse aux Estrogènes (ERE). Ils modulent ainsi l'expression de gènes au voisinage desquels se trouve un ERE.

1.2. Les récepteurs nucléaires aux estrogènes

1.2.1 Structures et fonctions des récepteurs nucléaires

La superfamille des RN regroupe des facteurs de transcription qui présentent une organisation structurale et fonctionnelle commune. En absence de ligand, certains de ces récepteurs sont localisés dans le noyau (en interaction ou non avec l'ADN), les autres étant localisés dans le cytoplasme. Les ligands de ces récepteurs sont de nature liposoluble, donc capables de diffuser à travers la membrane plasmique et ainsi d'entrer à l'intérieur de la cellule. C'est la liaison du ligand à son récepteur qui entraîne l'activation puis la dimérisation de celui-ci qui peut alors interagir avec une séquence cible nucléotidique appelée Elément de Réponse à l'Hormone (HRE). Une fois lié à l'ADN, le dimère de récepteurs activés recrute des co-régulateurs transcriptionnels (co-activateurs ou co-répresseurs). Ces RN sont des modulateurs de la transcription impliqués dans le contrôle d'un grand nombre de fonctions

physiologiques comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et l'homéostasie (Gronemeyer et Laudet, 1995, Mangelsdorf, *et al.*, 1995).

De plus, l'analyse phylogénétique de la superfamille des RN a montré une évolution commune de ces récepteurs et a permis de les classer en six sous familles. (1) Une sous famille contenant les récepteurs aux hormones thyroïdes, à l'acide rétinoïque, à la vitamine D et à l'ecdysone, les Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors (PPAR) ainsi qu'un grand nombre de récepteurs orphelins. (2) Une autre composée du récepteur X rétinoïde, du facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de Poulet ainsi que le facteur hépatique nucléaire 4. (3) Une correspondant au facteur de croissance nerveuse et les facteurs inductibles du groupe I-B des récepteurs orphelins. (4) La sous famille du facteur 1 stéroïdogénique et du récepteur au facteur 1 « fushi tarazu » de Drosophile. (5) Celle constituée du récepteur nucléaire du facteur 1 des cellules germinales. Enfin, (6) la sous famille regroupant les récepteurs aux hormones stéroïdes avec les récepteurs aux estrogènes, aux glucocorticoïdes, aux minéralocorticoïdes, à la progestérone et aux androgènes (Laudet, *et al.*, 1999, Escriva, *et al.*, 2004).

Les différentes activités des récepteurs nucléaires sont dues à la présence de cinq domaines protéiques distincts (Figure 1) (Altucci et Gronemeyer, 2001). Le premier domaine, **le domaine A/B**, contient la fonction AF-1 (Activation Function-1) responsable de l'activation de la transcription, indépendante de la fixation du ligand. Le second, **le domaine C**, forme deux doigts de zinc responsables de la liaison à l'ADN au niveau de séquences HRE. Chaque doigt de zinc possède quatre résidus cystéines, très conservés, qui établissent des liaisons de coordination avec un ion Zn^{2+} . Les boîtes P (pour Proximale) et D (pour Distale) jouent un rôle dans la reconnaissance des HRE (Figure 1b). **Le domaine D** est une petite région charnière entre les domaines C et E. Il participe à la fonction de dimérisation des récepteurs et de liaison de l'ADN (Figure 1). **Le domaine E** est le domaine de liaison de

l'hormone. Il participe également à d'autres fonctions, telles que la dimérisation des récepteurs, la localisation nucléaire dépendante du ligand, la liaison avec la protéine de choc thermique HSP90 et la transactivation dépendante du ligand ou fonction AF-2 (Figure 1).

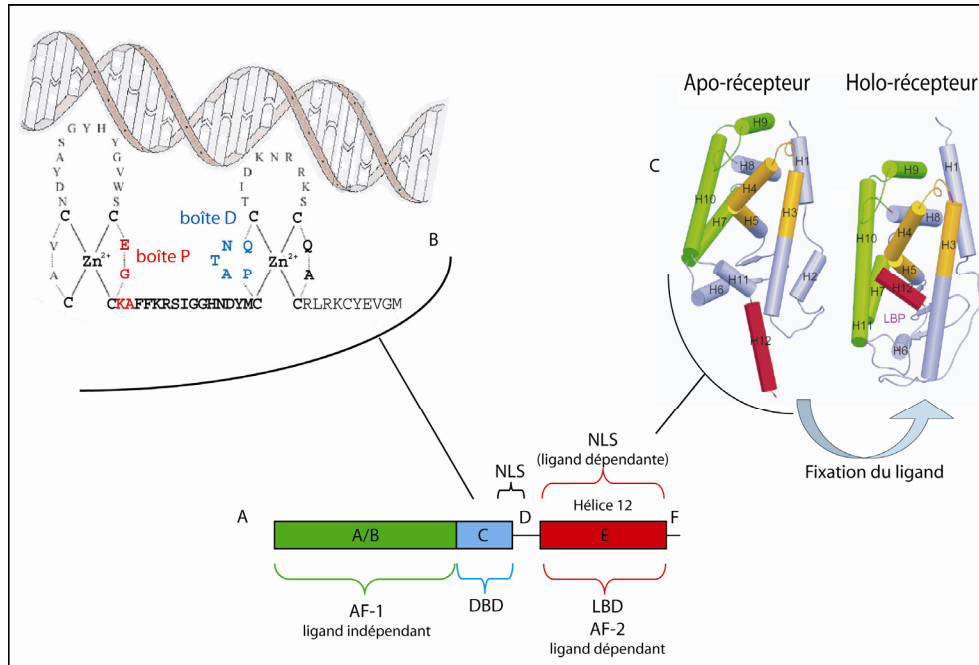


Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires. A) Fonctions associées aux différents domaines. Les domaines C et E, les plus conservés, sont encadrés des régions plus variables, les domaines A/B, D et F. La fonction d'activation indépendante du ligand (AF-1) est localisée dans le domaine A/B alors que celle dépendante du ligand (AF-2) se situe au niveau du domaine E. Les Séquences de Localisation Nucléaire (NLS), peuvent être constitutivement actives ou activées par la liaison du ligand (dans le domaine E), et permettent la reconnaissance du récepteur au niveau des pores nucléaires et sa translocation du cytoplasme vers le noyau. B) La fixation des récepteurs à l'ADN sur l'HRE fait intervenir des structures en doigts de zinc du domaine C (DBD). La reconnaissance des demi-sites des HRE et de la distance qui les sépare est assurée par la boîte P et la boîte D. C) La fixation d'un ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur qui passe de la configuration apo-récepteur à la configuration holo-récepteur (ou récepteur activé). Cette modification entraîne un mouvement de l'hélice α H12 (en rouge) qui permet ainsi l'interaction du RN avec les corégulateurs transcriptionnels. Le RN représenté est le récepteur à la vitamine D.

Le domaine E contient une large proportion d'acides aminés hydrophobes, constituant une poche de liaison pour l'hormone. La connaissance des structures 3D des domaines de liaison de l'hormone de certains récepteurs nucléaires a permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation du domaine AF-2. La comparaison des structures liées et non liées à l'hormone, suggère que la liaison de l'hormone induit un mouvement de l'hélice α H12 C-terminale qui vient recouvrir la poche de liaison du ligand (Figure 1c). Cette hélice α ainsi positionnée forme une surface d'interaction avec les cofacteurs transcriptionnels qui servent

eux-mêmes de pont avec la machinerie transcriptionnelle ou ont une activité histone acétyl transférase (Wurtz, *et al.*, 1996).

1.2.2 Les récepteurs aux estrogènes de types α et β

A ce jour, deux types de RE nucléaires ont été identifiés : le récepteur des estrogènes α (RE α) et le récepteur de type β (RE β). En général, ces deux récepteurs ne présentent pas le même profil d'expression tissulaire. Le RE α est majoritairement exprimé dans les ovaires, l'utérus et la glande mammaire alors que le RE β est présent dans les ovaires, les testicules et la prostate (Muramatsu et Inoue, 2000). Cependant, les deux isoformes peuvent coexister dans certains organes et notamment dans le système nerveux central (SNC). Dans ce dernier, certaines régions expriment uniquement RE α ou RE β , alors que d'autres régions expriment les deux types de récepteurs (Shughrue, *et al.*, 1997). Cependant, dans l'ensemble du SNC, RE α est le plus exprimé.

1.2.2.1 Organisation génique

Le RE α humain a été cloné en 1986 grâce au criblage d'une banque ADNc issue d'une lignée de cellules humaines de cancer du sein (MCF-7) (Walter, *et al.*, 1985, Green, *et al.*, 1986b). En 1996, un second récepteur, appelé RE β , a été isolé à partir d'une banque d'ADNc issue de prostate de Rat (Kuiper, *et al.*, 1996). Cette découverte a suscité l'intérêt de différentes équipes, qui ont identifié tour à tour des ARNm codant des protéines de 477, 485 puis 530 acides aminés (Mosselman, *et al.*, 1996, Enmark, *et al.*, 1997, Moore, *et al.*, 1998, Ogawa, *et al.*, 1998).

Chez l'Homme, les récepteurs aux estrogènes RE α et RE β sont les produits de deux gènes distincts (*ESR1* et *ESR2*, *estrogen receptor 1* et *2* respectivement) présents sur des chromosomes différents (locus 6q25.1 pour RE α et locus 14q23-24.1 pour RE β) (Gosden, *et al.*, 1986, Enmark, *et al.*, 1997).

ESR1 et *ESR2* sont constitués de huit exons et représentent respectivement plus de 140 kpb (kilo paires de bases) et environ 40 kpb. Une partie de l'exon 1 code une grande partie de la région A/B. Les exons 2 et 3 codent la partie terminale de la région A/B et la majeure partie de la région C. L'exon 4 code une partie de la région C, toute la région D et une partie de la région E. Le reste de la région E est codée par les exons 5 à 8. La fin de la partie codante de l'exon 8 correspond à la région F (Green, *et al.*, 1986a, Green, *et al.*, 1986c, Greene, *et al.*, 1986, Kuiper, *et al.*, 1996, Enmark, *et al.*, 1997). La maturation des ARNm *ESR1* et *ESR2* par épissage alternatif peut aboutir à la synthèse d'un grand nombre de transcrits différents tant au niveau pathologique que physiologique (Moore, *et al.*, 1998, Flouriot, *et al.*, 2000, Deroo et Korach, 2006). Par ailleurs, l'existence de promoteurs multiples est aussi une caractéristique de *ESR1*. Ainsi, la synthèse des messagers chez l'Homme est complexe et spécifique du tissu (Kos, *et al.*, 2001).

1.2.2.2 Structures protéiques

Le domaine AF-1 (région A et B) est impliqué dans les interactions protéine / protéine et dans la transactivation des gènes cibles (McInerney, *et al.*, 1998, Onate, *et al.*, 1998, Webb, *et al.*, 1998). Ce domaine permet vraisemblablement une modulation de la transcription en interagissant directement avec la machinerie transcriptionnelle ou *via* un co-activateur comme SRC1 (Steroid Receptor Coactivator 1), SRC2, SRC3 aussi appelé AIB1/ACTR (Amplified In Breast cancer-1/ACTR), CBP/p300 (Cyclic AMP responsive element binding protein Binding Protein) ou ERAP140 (ER Associated Protein) (Shao, *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que deux parties distinctes de ce domaine AF-1 du RE α étaient responsables respectivement de l'effet agoniste de E₂ et de l'effet antagoniste du 4-hydroxytamoxifène (OH-TAM) (McDonnell, *et al.*, 1995). En ce qui concerne RE β , cette fonction secondaire de AF-1 est absente (McInerney et Katzenellenbogen, 1996, Nilsson, *et al.*, 2001, Merot, *et al.*, 2004).

Contrairement aux domaines A/B, le domaine C est très conservé. En effet, les domaines de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs RE β et RE α , présentent 97% d'identité (Figure 2), en particulier au niveau de la boîte P, indispensable à l'interaction spécifique avec l'ADN. Ce qui permet aux deux récepteurs d'interagir avec l'ADN avec la même affinité (Klinge, 2001, Nilsson, *et al.*, 2001).

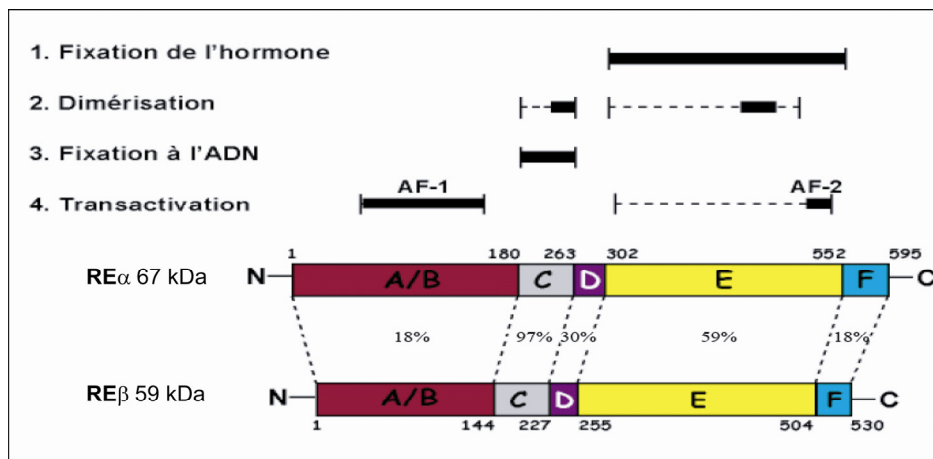


Figure 2 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de RE α et RE β humains. Les pourcentages d'identité entre les deux récepteurs sont précisés, ainsi que la fonction des différents domaines.

Le domaine D possède une Séquence de Localisation Nucléaire (NLS), impliquée dans les mouvements cytoplasme-noyau, ainsi que des sites de modifications post-traductionnelles (acétylation et sumoylation) (McEwan, 2004, Sentis, *et al.*, 2005). De plus, ce domaine charnière, qui change de conformation après fixation du ligand, est impliqué dans la fixation de corépresseurs (Chen et Evans, 1995, Horlein, *et al.*, 1995).

Le domaine E représente la deuxième région la plus conservée (59% d'identité) entre les récepteurs RE α et RE β (Figure 2) (Ruff, *et al.*, 2000, Nilsson, *et al.*, 2001). Cependant, la différence significative d'identité peut expliquer les différences d'affinités des deux types de récepteurs pour une même molécule (Escande, *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'efficacité de l'activation de la transcription par les récepteurs aux estrogènes est influencée par les interactions entre les régions N et C terminales du récepteur (Kraus, *et al.*, 1995). Lorsque le DBD est en interaction avec l'ADN, le domaine AF-1 (en absence de ligand) peut activer la transcription d'un gène cible de manière constitutive

(McInerney et Katzenellenbogen, 1996), mais l'activité transcriptionnelle maximale requiert une synergie avec le domaine AF-2 (Kumar et Thompson, 1999, Kumar et Thompson, 2003). Les domaines d'activation de la transcription (AF-1 et AF-2) ne présentent que très peu d'homologie entre les deux récepteurs (Figure 2). Ces données suggèrent que l'activation transcriptionnelle des gènes cibles pourrait être différente, en fonction de la nature du ligand et du récepteur.

De plus, un grand nombre de molécules de structures diverses sont capables d'interagir avec les RE. Une fois en interaction avec ceux-ci, elles vont influencer le positionnement de l'hélice 12 (domaine AF-2) et ainsi produire un effet qui dépendra de la nature du ligand fixé.

En effet, si le ligand lié aux récepteurs est un agoniste (E_2), la position de l'hélice 12 permet le recrutement de co-activateurs. En revanche, la fixation d'un antagoniste (raloxifène) a pour conséquence un changement d'orientation de cette zone, créant ainsi une région incapable de lier un co-activateur et/ou capable de recruter un co-répresseur (Figure 3) (Brzozowski, *et al.*, 1997, Shiau, *et al.*, 1998, Pike, *et al.*, 1999).

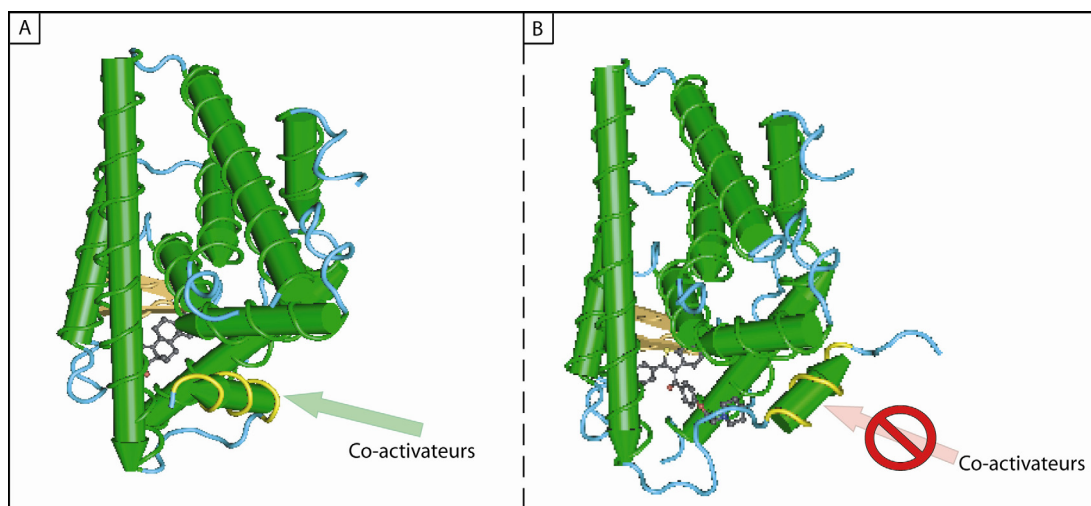


Figure 3 : Représentation schématique du domaine de liaison du ligand du RE α . (A) L'hélice 12 (en jaune) recouvre la poche de fixation du ligand après fixation d'estradiol-17 β permettant ainsi le recrutement de co-activateurs (flèche verte). (B) L'hélice 12 (en jaune) est positionnée différemment en présence d'un antagoniste (raloxifène) et empêche la fixation de co-activateurs.

Il est à noter que de récentes études ont prouvé l'existence d'une seconde poche de fixation du ligand. Cette région, dont la conformation n'est pas modulée par la fixation d'un ligand, n'a pas de fonction connue à l'heure actuelle (van Hoorn, 2002). Par ailleurs, la première poche de fixation du ligand étant plus hydrophobe que la seconde, les ligands ont tendance à privilégier l'interaction avec celle-ci (Ascenzi, *et al.*, 2006).

Enfin, le domaine F du RE α , quant à lui, jouerait un rôle dans la régulation de l'expression génique (Montano, *et al.*, 1995). Récemment, Yang et collaborateurs ont montré que ce domaine limite la dimérisation des RE α induite par E₂, ainsi que le recrutement de SRC1 (Yang, *et al.*, 2008).

1.2.3 Actions génomiques des RE

Les mécanismes moléculaires du contrôle de l'expression génique par les estrogènes reposent sur le fait que les RE sont des facteurs de transcription activés par un ligand (O'Malley, 2005). Les effets biologiques des RE résultent de la modification d'expression d'un ensemble de gènes cibles. Cette régulation de la transcription génique est accomplie par le recrutement des RE au voisinage des gènes cibles, soit par une **interaction directe** des RE au niveau de séquences spécifiques de l'ADN, soit par une **interaction indirecte** des RE par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription.

1.2.3.1 Actions génomiques directes

Les actions génomiques directes résultent de la liaison directe des RE activés, sous forme de dimères, au niveau d'un ERE. Ce dimère agit le plus souvent comme un activateur transcriptionnel quelle que soit la distance qui la sépare du promoteur, son orientation et sa position par rapport au site d'initiation de la transcription (Klinge, 2001).

Suite à une stimulation estrogénique, chacun des différents gènes régulés ne répond pas de la même manière dans le temps. Ainsi, il est apparu qu'une hiérarchie des gènes

contrôlés par les estrogènes existait et une classification a été proposée (Rories et Spelsberg, 1989, Dean et Sanders, 1996) (Figure 4). Dans les minutes qui suivent la stimulation estrogénique, une première série de gènes est exprimée. Il s'agit des **gènes précoces** (primary response genes ou early regulatory genes) qui sont directement induits par les RE activés, *via* un ERE, et dont l'expression ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* (Figure 4). Les protéines codées par les gènes précocement régulés ont différentes fonctions. Certaines sont des facteurs de transcription (par exemple FOS, JUN, MYC), d'autres des cytokines (TGF- α), des facteurs neuroendocrines (prolactine, ocytocine), des enzymes (créatine kinase B, cathepsine D), et aussi des protéines anti-apoptotiques (BCL-2).

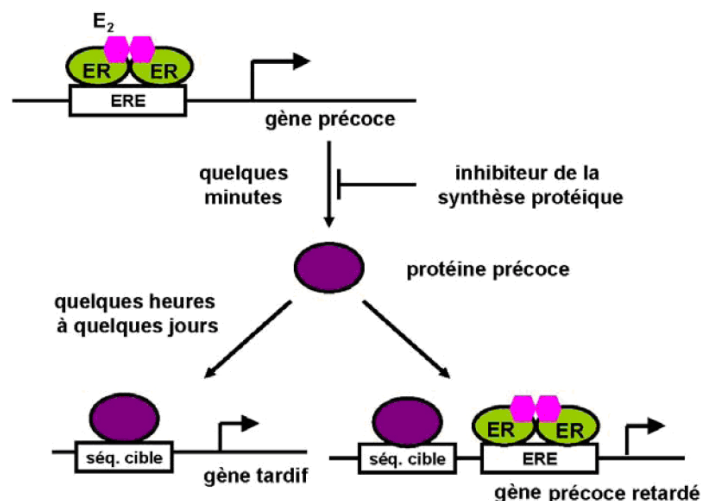


Figure 4 : Activation de la transcription des gènes précoces, précoces retardés, et tardifs par les estrogènes. ER : récepteur aux estrogènes ; ERE : élément de réponse aux estrogènes.

A cette phase précoce, succède une phase tardive dans les heures, voire les jours qui suivent la stimulation initiale par les estrogènes. Au cours de cette phase, deux catégories de gènes sont exprimées : les **gènes tardifs** (secondary response genes ou late structural genes) et les **gènes précoces retardés** (delayed primary response genes) (Figure 4). L'expression des gènes tardifs est contrôlée par les protéines codées par des gènes précocement régulés par les estrogènes et survient dans les heures qui suivent la stimulation estrogénique sauf en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique. L'expression des gènes tardifs dépend uniquement de

l'activation de la transcription par ces facteurs de transcription (Figure 4). Les gènes tardifs sont pour la plupart des gènes de structure. Les gènes précoces retardés sont régulés à la fois par la liaison directe du récepteur aux estrogènes activé et par la liaison d'une protéine précocement induite sur sa séquence cible.

1.2.3.2 Actions génomiques indirectes

Certains gènes, n'ayant aucun motif ressemblant à un élément ERE, sont capables de répondre à une stimulation estrogénique *via* des RE activés.

Pour la plupart des gènes concernés par une interaction indirecte avec les RE, le médiateur prédominant à cette réponse estrogénique est le facteur de transcription SP1 (O'Lone, *et al.*, 2004). La protéine SP1 se fixe sur l'ADN au niveau d'un site appelé Sp1 ou boîte GC, qui correspond à une séquence consensus 5'-GGGCGG-3' (Sugawara, *et al.*, 2004). D'après les données de la littérature, deux types d'interaction sont possibles (Figure 5). La première est une interaction indirecte nécessitant à la fois, la liaison de l'homodimère (E_2 -RE α -RE α - E_2) sur un ERE, ou un demi-site ERE, et la liaison du facteur SP1 sur sa séquence *cis*-régulatrice (Figure 5A). La seconde est une interaction directe du récepteur RE α ou RE β activé avec le facteur SP1 lié à la boîte GC (Figure 5B). Dong et collaborateurs (1999) ont recherché, par des expériences de transfection transitoire, la zone du promoteur de l'oncogène *bcl-2* nécessaire à l'activation transcriptionnelle par les estrogènes. L'analyse des séquences *cis*-régulatrices a révélé que la réponse estrogénique nécessitait la présence d'une séquence de 25 pb contenant deux sites Sp1. Des interactions de complexes RE α /SP1 avec ces deux séquences Sp1 ont, par ailleurs, été montrées par des expériences de retard sur gel (Dong, *et al.*, 1999). La fixation du RE à SP1 augmente l'efficacité de fixation au niveau du site Sp1 et contribue au recrutement de co-activateurs, et ceci indépendamment du ligand et du type de RE (Porter, *et al.*, 1997).

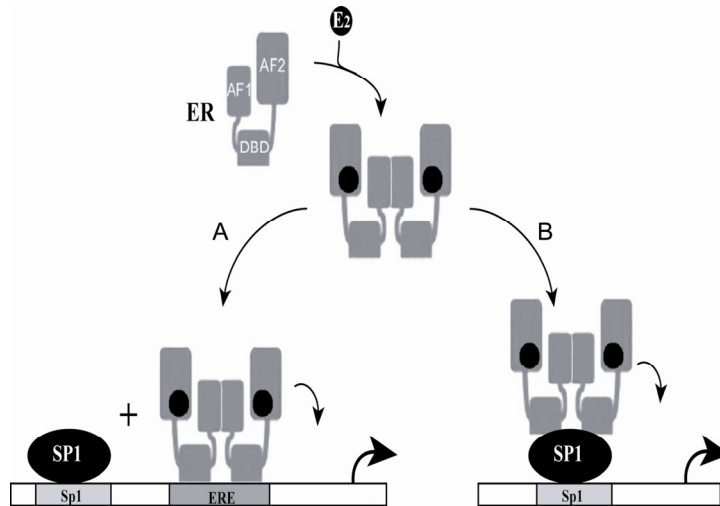


Figure 5 : Mode d'interaction du récepteur aux œstrogènes (RE) avec le facteur de transcription SP1. (A) Interaction indirecte du RE avec SP1. **(B)** Interaction directe du RE avec SP1. AF-1, AF-2, fonction d'activation 1 et 2 respectivement ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; ERE, élément de réponse aux œstrogènes ; E₂, estradiol-17β ; Sp1, site de fixation du facteur de transcription SP1.

Les RE peuvent interagir également avec les facteurs de **transcription FOS/JUN au niveau d'un site AP-1** pour stimuler l'expression génique (Figure 6). Cette action nécessite la liaison des protéines FOS et JUN au niveau du site AP-1 soit sous la forme d'homodimère JUN/JUN ou d'hétérodimère plus stable FOS/JUN (Figure 6) (Gaub, *et al.*, 1990).

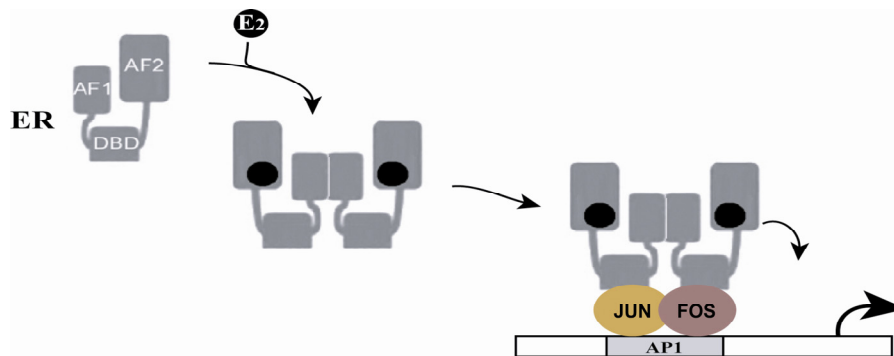


Figure 6 : Mécanisme d'action du RE au niveau d'un site AP1. Le RE, activé par l'hormone, vient interagir avec les facteurs de transcription FOS et JUN fixés au niveau du site AP1. AF-1, AF-2, fonction d'activation 1 et 2 respectivement ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; E₂, estradiol-17β.

Le site AP-1 correspond à la séquence consensus 5'-TGAGTCA -3'. Les complexes FOS/JUN résultent de combinaisons entre les différents membres de la famille FOS (c-FOS, FRA-1, FRA-2 et FOSB) et ceux de la famille JUN (c-JUN, JUNB et JUND). L'activation transcriptionnelle par E₂ nécessite une interaction entre le RE et les dimères FOS/JUN ou

JUN/JUN (Teyssier, *et al.*, 2001). Le gène de l'IGF-I (insulin-like growth factor I) est régulé par cette voie (Umayahara, *et al.*, 1997).

Quelques gènes sont régulés par les estrogènes *via* un **Elément de Réponse à l'AMPc (CRE)** dont la séquence consensus est 5'- TGACGTCA -3'. Le CRE est la cible des facteurs de transcription de la famille CREB/CREM/ATF. Sabbah et collaborateurs (1999) ont montré, par des expériences de transfection transitoire et de retard sur gel, que la stimulation estrogénique du gène de la cycline D1, dans des cellules HeLa, pouvait également s'expliquer par la liaison d'un complexe comprenant RE α à un site CRE (Sabbah, *et al.*, 1999). Dans ce mécanisme d'action des estrogènes, RE α interagit avec le dimère JUN/ATF-2 pour activer la transcription *via* le CRE (Figure 7).

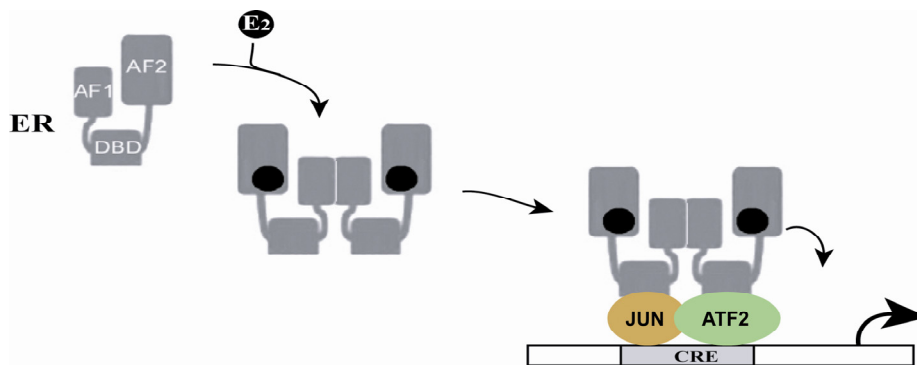


Figure 7 : Mécanisme d'action du RE au niveau d'un site CRE. Le RE, activé par l'hormone, vient interagir avec les facteurs de transcription JUN et ATF2 fixés au niveau du site CRE. AF-1, AF-2, fonction d'activation 1 et 2 respectivement ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; E₂, estradiol-17 β ; CRE, élément de réponse à l'AMPc.

Dans les cellules HeLa, l'activation des facteurs de transcription JUN et ATF-2 est indépendante de la voie de la protéine kinase A (PKA) activée consécutivement à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire.

1.2.4 Autres voies d'action des RE

1.2.4.1 Voie d'action indépendante du ligand

L'activation du RE par la fixation de E₂ entraîne une phosphorylation de certains résidus du domaine AF1 (région A/B). En absence de ligand, la sérine 118 peut être

phosphorylée *via* la voie des MAPK ou de la PI3K sous le contrôle de facteurs de croissance comme l'EGF, ou l'IGF-1 (Martin, *et al.*, 2003). Suite à ces phosphorylations, l'affinité du récepteur pour la séquence ERE est augmentée et la transcription de gènes cibles est activée indépendamment du ligand.

1.2.4.2 Voie d'action non génomique : les RE membranaires

Certains auteurs ont suggéré que les effets des estrogènes sont initiés par la liaison à une sous-population de récepteurs, localisés au niveau de la membrane plasmique (Razandi, *et al.*, 1999). La protéine GRP30 est un récepteur couplé à une protéine G qui lie E₂ avec une grande affinité et dont l'expression a été montrée dans le cerveau (Filardo et Thomas, 2005). D'autres études montrent que le RE α peut être S-palmitoylé au niveau de la cystéine 447 et ainsi interagir avec la membrane plasmique au niveau des cavéoles et lier la cavéoline-1 (Kim, *et al.*, 1999, Acconcia, *et al.*, 2004, Acconcia, *et al.*, 2005). Les récepteurs seraient fonctionnels sous forme de dimères lorsqu'ils sont activés par les estrogènes (Razandi, *et al.*, 2000). Les récepteurs membranaires des estrogènes sont associés à une variété de molécules signalantes comme la protéine G-Ras (Razandi, *et al.*, 1999), la kinase Src (Migliaccio, *et al.*, 1998), la sous unité régulatrice de la PI3-kinase (Simoncini, *et al.*, 2000) et Shc (Song, *et al.*, 2002). La cascade d'événements induite par le récepteur membranaire activé peut aboutir à la modulation de l'expression de certains gènes ou à la modulation de l'activité de certaines protéines. Cependant, le rôle exact que jouent les récepteurs membranaires dans l'action globale des estrogènes reste à déterminer.

1.3. Les ligands des récepteurs aux estrogènes

1.3.1 Les estrogènes physiologiques

Les estrogènes, comme tous les stéroïdes, sont des dérivés naturels des cyclopentanophénanthrènes synthétisés à partir du cholestérol (Figure 8). En effet, ce lipide, d'origine alimentaire, qui entre dans la composition des membranes plasmiques, sert également de précurseur à la vitamine D, aux sels biliaires et surtout aux hormones stéroïdiennes.

Il existe trois estrogènes physiologiques (Figure 8) : l'estrone (E_1), l'estradiol-17- β (E_2) et l'estriol (E_3).

L'**estrone** (E_1) est produite par aromatisation de l'androsténone, d'origine gonadique et surrénalienne. Chez la femme, après la puberté, 50 % de l'estrone sont sécrétés par les ovaires et les glandes surrénales, alors que chez l'enfant prépubère, l'homme et la femme ménopausée, la majeure partie de l'estrone provient de la conversion périphérique (foie, tissus adipeux et muscles) de l'androsténone par l'aromatase (Nonnenmacher, 2003). L'estrone est biologiquement inactive. Cependant, une fois conjuguée à un groupement sulfate (*via* l'estrogène sulfotransférase), elle devient la forme circulante des estrogènes dans le sang (Pasqualini, 2004). De plus, E_1 peut être convertie en forme active E_2 sous l'action de la 17- β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase de type 1 (17-HSD type 1) (Gast, *et al.*, 1989, Luu The, *et al.*, 1989). Cette conversion est réversible sous l'effet de la 17- β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase de type 2 (17-HSD type 2) (Wu, *et al.*, 1993) (Figure 8). Ainsi, E_1 permet de transporter E_2 et de moduler son taux au niveau des organes cibles.

L'**estradiol-17 β** (E_2) peut être synthétisé soit par réduction de E_1 par la 17-HSD type 1 soit par aromatisation de la testostérone sous l'action d'une aromatase constituée d'un cytochrome P-450 et d'une cytochrome réductase à NADPH (Figure 8). Dans l'espèce

produit en quantité massive par l'unité foeto-placentaire. La prégnénolone placentaire est réduite en DeHydroepiAndrostérone Sulfate (DHAS) dans la surrénale fœtale. La DHAS retourne au placenta où elle est transformée en androstènedione puis en E₃. Les concentrations d'E₃ augmentent fortement au cours de la grossesse et sont donc le reflet de la coopération foeto-placentaire et de la vitalité fœtale (Nonnenmacher, 2003). Cependant, le rôle de E₃ n'est pas encore connu à l'heure actuelle.

1.3.2 Les xénoestrogènes

Il existe plusieurs types de molécules, stéroïdiennes ou non, capables de lier les RE. Certains composés vont produire les mêmes effets au niveau des différents organes cibles (agonistes ou antagonistes). D'autres vont présenter un effet qui sera fonction de la nature du tissu cible : on parle alors de Modulateurs Sélectifs des RE (SERM).

1.3.2.1 Les molécules d'origine naturelle

Il existe deux types de composés d'origine naturelle (végétale) capables de lier les RE et d'engendrer une activité estrogénique sur le système nerveux central, d'induire l'oestrus et de stimuler la prolifération des cellules du tractus génital chez la femelle (Knight et Eden, 1995). Ce sont les **mycoestrogènes** et les **phytoestrogènes**.

Les mycoestrogènes, sont des mycotoxines non stéroïdiennes dont la plus étudiée est la **zéaralénone** (ZEA) (Figure 9). Cette molécule est un métabolite secondaire produit par un grand nombre d'espèces de *Fusarium fungi* proliférant sur les céréales (Ryu, *et al.*, 2002, Obremski, *et al.*, 2003). Cette toxine est donc susceptible d'être retrouvée dans l'alimentation animale et humaine (Kim, *et al.*, 1993, Yuwai, *et al.*, 1994). Une contamination de la nourriture provoque chez l'animal : vulvovaginites, grossesses nerveuses, oestrus constant et stérilité (Etienne et Dourmad, 1994). Cette molécule est aussi connue pour induire une puberté précoce chez les jeunes filles (Pitt, 2000, Massart, *et al.*, 2008). La ZEA est un

agoniste pur des estrogènes pour RE α et est à la fois agoniste (seule) et antagoniste (en présence de E $_2$) pour RE β (Kuiper, *et al.*, 1998).

Les phytoestrogènes sont des composés phénoliques non stéroïdiens, produits par les plantes, qui présentent une similarité structurale et fonctionnelle avec E $_2$. Il existe aussi des composés non phénoliques (terpénoïdes et saponines) capables de mimer l'activité de E $_2$ (Dijsselbloem, *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, on dénombre cinq familles de composés phénoliques produits par les plantes et considérés comme des phytoestrogènes : (1) les isoflavonoïdes présents dans les légumineuses, (2) les coumestanes présents dans les luzernes (alimentation animale), (3) les stilbènes présents dans le raisin et dans le vin, (4) les lignanes présents dans diverses céréales (graines de lin, son, seigle, sarrasin, millet, soja, avoine et orge) et (5) les flavonoïdes présents dans les agrumes (Cos, *et al.*, 2003, Cornwell, *et al.*, 2004, Dijsselbloem, *et al.*, 2004) (Figure 9).

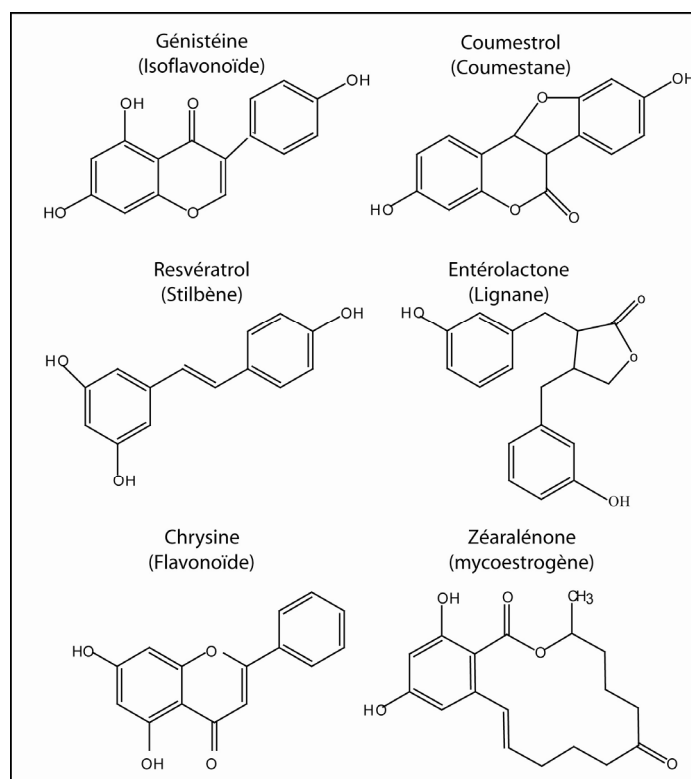


Figure 9 : Structures des principaux représentants des cinq familles de phytoestrogènes et d'un mycoestrogène. Formules développées de la génistéine, du coumestrol, du resvératrol, de l'entérolactone, de la chrysrine et de la zéaralénone.

Par ailleurs, une étude a révélé que certains intermédiaires dans la synthèse des isoflavones, comme les déoxibenzoïnes, peuvent être considérés comme des phytoestrogènes (Fokialakis, *et al.*, 2004). Dans ce rapport, nous décrirons succinctement les effets des représentants des 5 familles de phytoestrogènes : (1) la génistéine, (2) le coumestrol, (3) le resvératrol, (4) l'entérolactone et (5) la chrysrine.

La génistéine du soja, après hydrolyse par les β -glucuronidases bactériennes (de la flore intestinale) et tumorales produit la **génistéine**, phytoestrogène le plus étudié (Yuan, *et al.*, 2003). La génistéine (Figure 9) interagit avec les deux formes de RE (Maggiolini, *et al.*, 2001), mais présente une plus forte affinité pour RE β (Gutendorf et Westendorf, 2001). Des études sur des cellules MCF-7 dérivées de cancer du sein ont montré que cette molécule, à concentration élevée (50 et 100 μ M) pouvait *via* RE α inhiber l'expression de ce récepteur (aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel) et inhiber la croissance cellulaire en réduisant l'expression du facteur de réponse au sérum et en inactivant les tyrosines kinases (Chen, *et al.*, 2003). D'autres études ont rapporté qu'une forte concentration de génistéine sur des MCF-7 induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et déclenche l'apoptose après traitement de plus de 48 heures (Magee et Rowland, 2004). De plus, ce phytoestrogène potentialise l'effet antitumoral de la chimiothérapie par CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone) dans le traitement de lymphomes non Hodgkiniens (Mohammad, *et al.*, 2003).

Le **coumestrol** (Figure 9) est un puissant phytoestrogène présent dans le soja (Lookhart, 1979), la luzerne et les germes de trèfle (Franke, *et al.*, 1995). Il est capable d'interagir avec les deux RE avec la même affinité que E₂ (Kuiper, *et al.*, 1998). Cette molécule qui présente un effet estrogénique supérieur à celui produit par la génistéine (Markiewicz, *et al.*, 1993) prévient la réduction de la densité osseuse chez le Rat (Draper, *et al.*, 1997, Ye, *et al.*, 2003). De plus, le coumestrol agit sur le métabolisme lipidique (réduction

de l'hypocholestérolémie). Cependant, cette molécule stimule aussi la prolifération des cellules MCF-7 et induit une hypertrophie utérine importante (Dodge, *et al.*, 1996).

Le **resvératrol** (Figure 9) est à l'origine du concept de « French paradox » décrit dans les années 70. En effet les études épidémiologiques de l'époque révélaient une corrélation inverse entre la consommation de vin rouge en France et le nombre de maladies cardiovasculaires. A l'heure actuelle, plusieurs études ont permis de découvrir les effets bénéfiques du resvératrol sur la santé (Fremont, 2000). En effet, ce composé, qui joue un rôle important dans le métabolisme lipidique, interagit avec les lipoprotéines plasmatiques (Belguendouz, *et al.*, 1998) et inhibe l'oxydation de LDL (low-density lipoprotein) *in vitro* (Frankel, *et al.*, 1993, Kerry et Abbey, 1997). Par ailleurs, *in vitro*, le resvératrol réduit l'agrégation plaquettaire (Wang, *et al.*, 2002) et la production de formes réactives de l'oxygène (ROS) par les polynucléaires (Rotondo, *et al.*, 1998). *In vivo*, il favorise la vasorelaxation (Li, *et al.*, 2000) et surtout présente des propriétés anti tumorales (Jang, *et al.*, 1997, Gusman, *et al.*, 2001).

L'**entérolactone** (Figure 9) est un lignane issu de la conversion du secoisolariciresinol diglycoside par les bactéries de la flore intestinale (Axelson, *et al.*, 1982). C'est ce métabolite qui possède une activité biologique et non son précurseur. Les lignanes sont les phytoestrogènes les plus souvent retrouvés dans les régimes alimentaires des populations occidentales (Raffaelli, *et al.*, 2002). L'entérolactone présente un intérêt thérapeutique dans le traitement de l'ostéoporose (Feng, *et al.*, 2008) et semble posséder des propriétés anti-prolifératives et anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* (Thompson, 1998, Power et Thompson, 2003, Bergman Jungstrom, *et al.*, 2007). Cependant, les connaissances actuelles restent assez contradictoires sur l'implication d'une consommation d'entérolactone dans la protection contre le cancer du sein. D'après une récente étude clinique, les lignanes n'auraient aucun effet sur les risques de développement de cancer du sein (Verheus, *et al.*, 2007). Selon

d'autres études, il semblerait qu'une consommation élevée de lignanes chez une femme pré-ménopausée pourrait être un facteur de risque de cancer du sein. Cependant, les mécanismes liant ces phytoestrogènes à la maladie ne sont pas encore élucidés (Thompson, 1998, Adlercreutz, 2002b, Boccardo, *et al.*, 2006).

La **chry sine** (Figure 9) est un flavanoïde extrait de la passiflore (*passiflora cœrulea*) qui interagit *in vitro* avec le RE α et provoque une transactivation d'un gène cible *via* ce récepteur (Liu, *et al.*, 2006). Une concentration élevée de ce phytoestrogène (10 μ M) stimule la prolifération de cellules MCF-7 mais n'a aucun effet sur la prolifération des fibroblastes. De plus, la chry sine inhibe l'activité de l'aromatase dans les fibroblastes (van Meeuwen, *et al.*, 2007).

1.3.2.2 Les molécules d'origine synthétique

Il existe à l'heure actuelle différents types de molécules de synthèse capables d'interagir avec les RE : les **hormones de synthèse** (diéthylstilbestrol, éthinylestradiol), les **antagonistes purs** (ICI 182,780...) et les **SERM** ou antagonistes partiels (tamoxifène, raloxifène, tibolone...), ainsi que les **polluants industriels ou perturbateurs endocriniens** (parabènes, DDT, PCB...)

1.3.2.2.1 Molécules à usage thérapeutique

Le **DiEthylStilbestrol** (DES ; Figure 10) synthétisé par E.G. Dodds en 1938 (Dodds, *et al.*, 1938), a été utilisé entre 1940 et 1977 chez les femmes enceintes pour prévenir les avortements spontanés et les hémorragies gravidiques (Palmlund, *et al.*, 1993). Les enfants ayant été exposés *in utero* au DES ont développé des pathologies et des malformations lourdes. En effet, les filles ont développé des cancers du vagin et du col de l'utérus (Herbst, *et al.*, 1971) ainsi que des anomalies structurales, morphologiques et fonctionnelles du vagin, des trompes, du col et du corps de l'utérus, pouvant entraîner des troubles de la fertilité. Les

garçons présentent des atteintes de l'appareil uro-génital (kystes épидидymaires, anomalies testiculaires...) (Bibbo, *et al.*, 1977). Actuellement, le DES reste commercialisé en France dans le cadre du traitement de certaines pathologies prostatiques (d'après les recommandations de l'Agence Française Sanitaire des Produits de Santé, 2003).

L'**ICI 182,780** (« fulvestrant ou Faslodex[®] » ; AstraZeneka ; Figure 10) est un stéroïde de synthèse présentant une activité antagoniste pur du RE α . Cette molécule limite l'interaction RE/ERE, réduit la dimérisation du récepteur, augmente sa dégradation et limite son entrée dans le noyau (Arbuckle, *et al.*, 1992, Dauvois, *et al.*, 1993, Parker, 1993, Pink et Jordan, 1996). De tels mécanismes ont pour conséquence de bloquer l'activité estrogénique en annihilant l'activité transcriptionnelle du RE α ainsi qu'en réduisant la quantité de ce récepteur. Cette molécule est utilisée dans le traitement d'un cancer du sein RE positif, résistant à une thérapie antihormonale (ex : tamoxifène) préalable (McCormack et Sapunar, 2008).

Le **tamoxifène** (AstraZeneka ; Figure 10) est un dérivé triphényléthylénique synthétique capable de lier le RE α . Ce composé est métabolisé au niveau hépatique en OH-TAM par un cytochrome P450 (CYP2D6) (Desta, *et al.*, 2004). Cette molécule inhibe la fonction transactivatrice AF-2 et stimule la fonction AF-1. On peut donc qualifier cette molécule de SERM puisqu'elle présente un effet agoniste (*via* sa fonction AF-1) et antagoniste (*via* AF-2). L'effet estrogénique ou anti-estrogénique sera fonction de la localisation tissulaire. En effet, le tamoxifène est un antagoniste de E₂ au niveau du sein, il a donc été utilisé dans le cadre du traitement du cancer du sein hormonodépendant (Morrow et Jordan, 2000). Il présente, en revanche, chez la femme ménopausée un effet cardioprotecteur en modulant le métabolisme lipidique (effet agoniste de E₂) (Love, *et al.*, 1994). Ce SERM peut aussi agir sur la densité osseuse, en l'augmentant chez la femme ménopausée, ou en la réduisant chez la femme pré-ménopausée traitée pour un cancer du sein (Saji et Kuroi, 2008).

Enfin, ce composé présente un effet agoniste de E₂ au niveau de l'utérus, ce qui lors d'un traitement à long terme, peut induire le développement de cancer de l'endomètre (Saim, *et al.*, 2008).

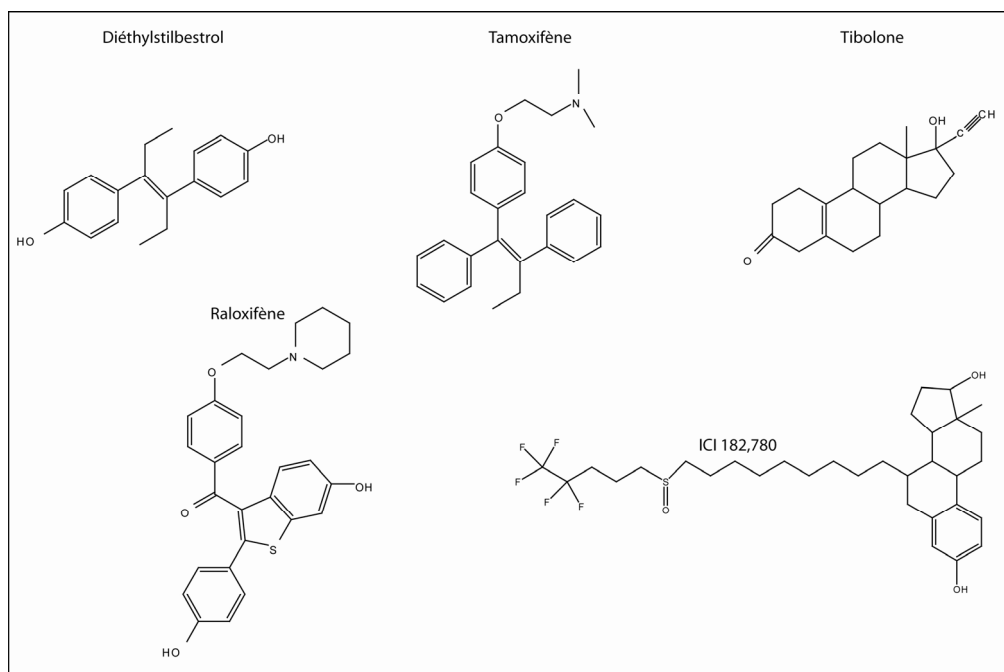


Figure 10 : Classification des xénoestrogènes d'origine synthétique à usage thérapeutique. Formules développées du diéthylstilbestrol, de l'ICI 182,780, du tamoxifène et du raloxifène.

Le **raloxifène** (Eli Lilly ; Figure 10) est un benzothiophène qui lie préférentiellement le RE α . Il présente un effet positif au niveau de la densité osseuse et surtout n'entraîne pas d'effet agoniste de E₂ au niveau de l'endomètre (Cohen, *et al.*, 2000). Cette molécule, très efficace dans le cadre du traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées, apparaît être aussi un candidat très intéressant dans le cadre du traitement du cancer du sein (Martino, *et al.*, 2004a, Martino, *et al.*, 2004b). Par ailleurs, le raloxifène semble avoir un impact positif sur le système cardiovasculaire (Blumenthal, *et al.*, 2004). Cependant, la persistance ou l'augmentation de bouffées de chaleur et l'augmentation du risque de thromboembolie lors d'un traitement peut être un facteur limitant l'utilisation prolongée du raloxifène (Cohen et Lu, 2000, Miller, *et al.*, 2003). Il est à noter qu'un dérivé du raloxifène, l'arxoxifène (LY 353,381) présente 100 fois plus d'affinité pour le RE que le raloxifène et semble avoir des

effets estrogéniques plus puissant. Cette molécule pourrait être efficace dans le cadre du traitement du cancer du sein (Buzdar, *et al.*, 2003, Fabian, *et al.*, 2004).

La **tibolone** (Organon ; Figure 10) est un stéroïde de synthèse métabolisé au niveau hépatique en deux métabolites estrogéniques (3α et 3β -OH-tibolone) capables de lier les RE, et un de ces métabolites est capable d'interagir avec les récepteurs de la progestérone et des androgènes. Cette molécule est utilisée en Europe et au Canada afin de traiter les symptômes climactériques (changements endocriniens, somatiques et psychologiques qui surviennent à la ménopause), les dysfonctionnements sexuels et l'ostéoporose. En effet, la tibolone réduit les bouffées de chaleur et l'insomnie, et améliore l'humeur (Genazzani, *et al.*, 1987, Landgren, *et al.*, 2002). Ce SERM qui augmente la densité osseuse chez les femmes ménopausées (Gallagher, *et al.*, 2001, Jacobsen, *et al.*, 2008) permet aussi d'améliorer la libido (Nathorst-Boos et Hammar, 1997, Doren, *et al.*, 2001).

1.3.2.2.2 Les perturbateurs endocriniens

Les diverses molécules présentées ci-dessus sont destinées à un usage thérapeutique (contraception, traitement de la ménopause et des cancers). Toutefois, elles sont retrouvées dans l'environnement au niveau des eaux usées, des eaux de surface ou des nappes phréatiques (Yin, *et al.*, 2002, Boyd, *et al.*, 2003). Dans le cadre d'une exposition non thérapeutique ces molécules sont considérées comme des perturbateurs endocriniens potentiels susceptibles d'affecter les animaux (féminisation des poissons) (Jobling, *et al.*, 1998) voire l'Homme (reproduction, système immunitaire) (Inadera, 2006).

De plus, de nombreuses molécules n'ayant aucun rôle thérapeutique sont classées comme des perturbateurs endocriniens. Le **DichloroDiphénylTrichloroéthane** (DDT ; Figure 11), utilisé comme pesticide dans les pays développés jusque dans les années 80, et en particulier son métabolite majoritaire, le 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)-éthylène, sont très souvent retrouvés chez les poissons présentant des anomalies du développement gonadique (Zhang et

Hu, 2008). Ces pesticides organochlorés engendrent des troubles de la fertilité chez la femme en altérant le développement et le fonctionnement ovarien et utérin (Tiemann, 2008). Par ailleurs, une exposition au DDT avant la puberté augmente les risques de développer un cancer du sein à l'âge adulte (Clapp, *et al.*, 2008).

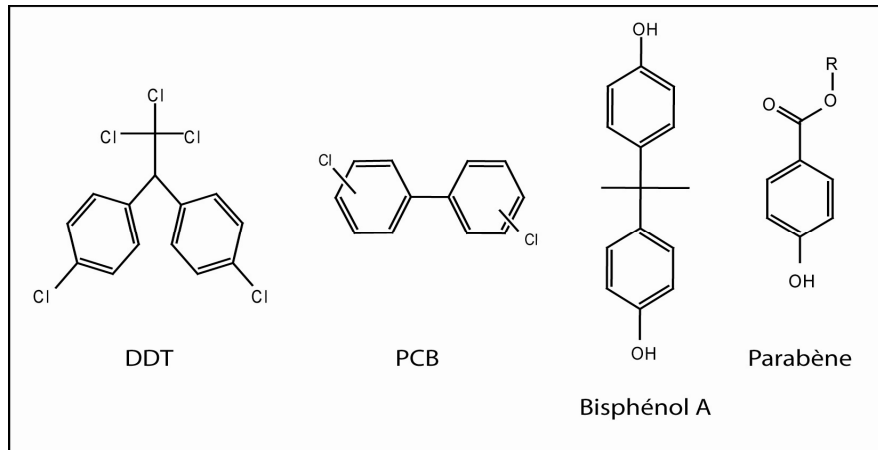


Figure 11 : Structures des perturbateurs endocriniens. Formules développées du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), des PCB (polychlorobiphényles), du Bisphénol A (BPA), des parabènes.

Certains polluants industriels comme les **PolyChloroBiphényles** (PCB ; Figure 11) sont considérés comme des perturbateurs endocriniens ayant un impact sur le métabolisme des estrogènes. De plus, ces molécules réduisent l'expression de la catéchol-o-méthyltransférase *via* le RE α dans des MCF-7, ce qui augmenterait les risques de cancérogenèse (Ho, *et al.*, 2008).

L'Homme est, par ailleurs, exposé tout au long de sa vie à d'autres composés considérés comme des perturbateurs endocriniens (dérivés plastiques, conservateurs). En effet, le **BisPhénol A** (BPA ; Figure 11), initialement développé dans les années 30 comme estrogène de synthèse, n'a jamais été utilisé à ces fins (remplacé par le DES, plus prometteur à l'époque). Cependant, ce composé est actuellement largement utilisé dans la fabrication de récipients en polycarbonate (bouteille, biberon, conserve) ou de résines époxy (prothèses dentaires). Ce composé estrogénique module l'expression du RE α chez le Rat en fonction du sexe (diminution chez le mâle et augmentation chez la femelle) et affecte le système

immunitaire (diminution du taux splénique d'I12, I112, de INF- γ et de TNF- α) (Miao, *et al.*, 2008). Par ailleurs, des rats adultes exposés au BPA *in utero* présentent des lésions pré-néoplasiques et des carcinomes au niveau de la glande mammaire (Soto, *et al.*, 2008).

Certains conservateurs (alimentaires et cosmétiques) peuvent aussi être assimilés à des perturbateurs endocriniens : c'est le cas des **parabènes** (Figure 11). Okubo et collaborateurs ont montré que certains de ces composés comme le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène, le butylparabène et l'isopropylparabène induisaient la prolifération de cellules MCF-7 *via* le RE α . Les auteurs ont aussi montré que ces composés présentaient une affinité identique pour les RE α et β , celle-ci est proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle (Okubo, *et al.*, 2001). Ces travaux ont été confirmés par Vanparys et collaborateurs qui ont observé un effet prolifératif des parabènes sur la lignée MCF-7 proportionnel à la longueur de leurs chaînes alkyls (Vanparys, *et al.*, 2006).

2. Gènes régulés par les estrogènes

2.1. Mécanisme de régulation transcriptionnelle

Dans le noyau des cellules, les récepteurs restent dans un état inactif jusqu'à la liaison de l'hormone, à la suite de laquelle ils s'associent à l'ADN et interagissent avec des corégulateurs pour activer la transcription de gènes cibles. En absence de ligand, les récepteurs des estrogènes inactifs sont complexés avec des protéines chaperons : deux protéines de choc thermique HSP 90 et une protéine chaperon de 23 kDa (protéine associée à HSP 90) (Ratajczak, 2001, Oxelmark, *et al.*, 2003). Dans le cas du RE α humain, les deux HSP 90 peuvent être associées à une HSP70 et une protéine p55 (appartenant à la famille des disulfides isomérasés) (Landel, *et al.*, 1995) (Figure 12).

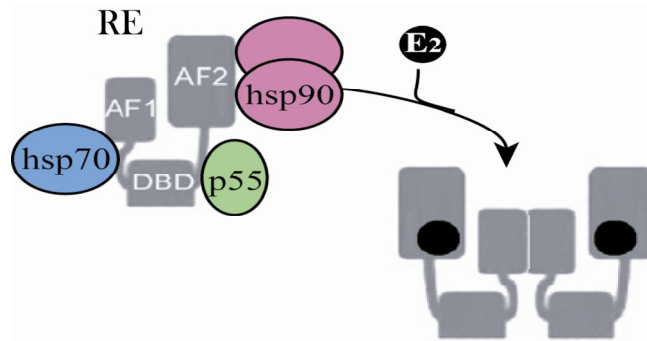


Figure 12 : Différents états du récepteur aux estrogènes. En absence de ligand, RE est séquestré par les protéines chaperons HSP90, HSP70 et p55. Lors de la fixation de E₂ au niveau de RE, il y a libération des protéines chaperons et dimérisation de RE. HSP 70 et HSP 90 : protéines de choc thermique de 70 et 90 kDa respectivement.

La fixation du ligand sur le domaine E du récepteur induit plusieurs événements : (1) dissociation du complexe protéique récepteur–protéines chaperons, (2) phosphorylations et (3) changement conformationnel du récepteur. Une fois lié à l'ADN, le RE va moduler l'expression des gènes cibles.

L'activité régulatrice du récepteur aux estrogènes fait le plus souvent intervenir des corégulateurs (coactivateurs ou corépresseurs). La plupart de ces corégulateurs ne sont pas spécifiques d'un récepteur nucléaire. Les coactivateurs agissent en complexes multiprotéiques (Figure 13) et possèdent une activité histone acétyltransférase. L'acétylation des histones diminue leurs interactions avec l'ADN, ce qui entraîne la décondensation de la chromatine et permet l'action de protéines impliquées dans l'initiation de la transcription (Nilsson, *et al.*, 2001). L'inactivation chez la Souris de l'un d'entre eux, SRC-1, induit une résistance aux estrogènes (Xu, *et al.*, 1998). Les corépresseurs ont, au contraire, une activité histone désacétylase, ou recrutent des protéines à activité désacétylase, ce qui entraîne une condensation de la chromatine défavorable à l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription réprimant ainsi la transcription des gènes cibles (Margueron, *et al.*, 2004). La proportion variable de ces cofacteurs dans les cellules des divers tissus cibles permet d'expliquer, en partie, la spécificité tissulaire des réponses aux estrogènes (Sheppard, *et al.*, 2003, Margueron, *et al.*, 2004).

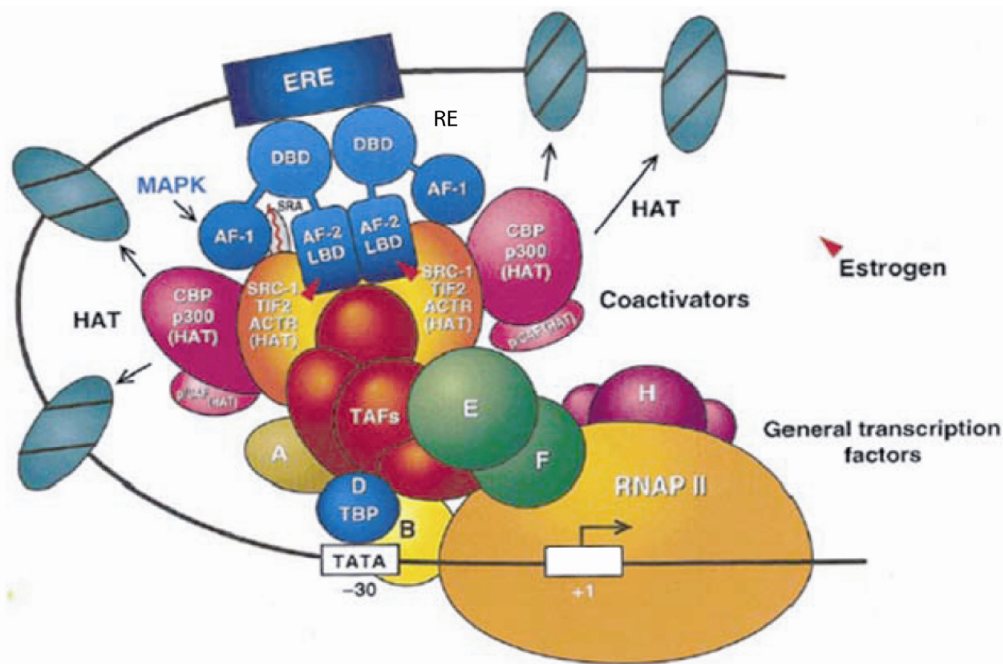


Figure 13 : Modèle schématique du complexe d'initiation de la transcription formé sur la boîte TATA du promoteur d'un gène cible avec un ERE. Les récepteurs aux estrogènes activés par le ligand recrutent des protéines à activité histone acétyltransférase (SRC-1, CBP/p300, TIF2/SRC2 (Transcriptional Intermediary Factor 2), ACTR/SRC3) permettant de décondenser la chromatine. Les interactions entre l'ARN polymérase II (RNAP II), les facteurs généraux de la transcription (TAFs) et les complexes RE-coactivateurs protéiques sont schématisées (Muramatsu et Inoue, 2000).

2.2. Différents gènes cibles

Ainsi, comme vu précédemment chez l'Homme, les estrogènes, *via* les RE, modulent l'expression de nombreux gènes par action directe ou indirecte. Il existe un grand nombre de gènes dont l'expression est régulée par les RE et dont les produits appartiennent à différentes catégories de protéines : des récepteurs, des hormones, des enzymes et des protéines de structure (Tableau I). Tous ces différents produits, au sein de la cellule, participent à différentes fonctions comme la survie, la croissance, la division, la signalisation et le maintien cellulaires (Tableau I).

Tableau II : Exemple de quelques gènes régulés par une interaction directe des RE avec l'ADN au niveau d'une séquence ERE. ^a La séquence palindromique est indiquée en gras. ^b Pour l'ERE consensus et l'ERE imparfait, le « + » indique une position sur le brin codant ; le « - » indique une position sur le brin non codant. Schéma modifié d'après O'lonne *et al.* et complété (*) d'après Vernier-Magnin *et al.* (O'lonne, *et al.*, 2004, Vernier-Magnin, *et al.*, 2005).

	Organisme	Gène	Séquence ^a (5'-3')	Brin ^b
ERE consensus	Homme	EBAG9	c AGGTCA ggg TGACCT c	+
ERE imparfait	Homme	<i>Efp (ZNF147)</i>	a GGGTCA tgg TGACCC t	+
		<i>COX7RP</i>	g GGGTCA agg TGACCC c	+
		<i>TERT</i>	t TGGTCA ggc TGATCT c	+
		pS2 (<i>TFF1</i>)	a AGGTCA cgg TGGCCA c	+
		<i>Lactoferrin</i>	c AGGTCA agg CGATCT t	+
		<i>Cathepsin D</i>	c CGGTCA cgt GGGCCG g	-
		<i>TGFα</i>	g GGGTCA gctg TGCCCC g	+
	Rat	<i>HMG CoA reductase</i>	g CCGTCA ggc TGAGCA g	+
		<i>Luteinizing hormone β</i>	a TGGACA gatgg TGTCCC g	+
	Cobaye	<i>Gec1/gabarapl1*</i>	c GGGTCA acg TGACGT c	+

Les récepteurs, activés par la liaison à l'hormone, se lient avec une forte affinité à la séquence consensus ERE définie ci-dessus. Cependant, certains ERE diffèrent de cet ERE consensus par une ou plusieurs bases (Tableau II), ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de liaison des RE activés à ces ERE imparfaits (Loven, *et al.*, 2001b). Ceci explique, au moins en partie, comment la séquence de l'ERE peut être un déterminant important, mais également comment elle pourrait jouer un rôle dans la détermination du type de RE interagissant à son niveau (Loven, *et al.*, 2001a, Loven, *et al.*, 2001b, Wood, *et al.*, 2001, Yi, *et al.*, 2002).

2.4. Exemple de gène régulé par les estrogènes : *Gec1*

Le gène *gec1* (*glandular epithelial cell protein 1*) est un gène précocement régulé par les estrogènes, identifié au laboratoire (EA3922) à partir d'une banque d'ADNc issue d'une culture primaire de cellules épithéliales glandulaires d'endomètre (GEC) de Cobaye (Pellerin, *et al.*, 1993). Le gène *gec1* de Cobaye (Figure 14) est constitué de 10 065 pb contenant 4 exons et l'ADNc complet comporte 1921 pb (numéro d'accèsion GenBank AF287012) (Vernier-Magnin, *et al.*, 2001).

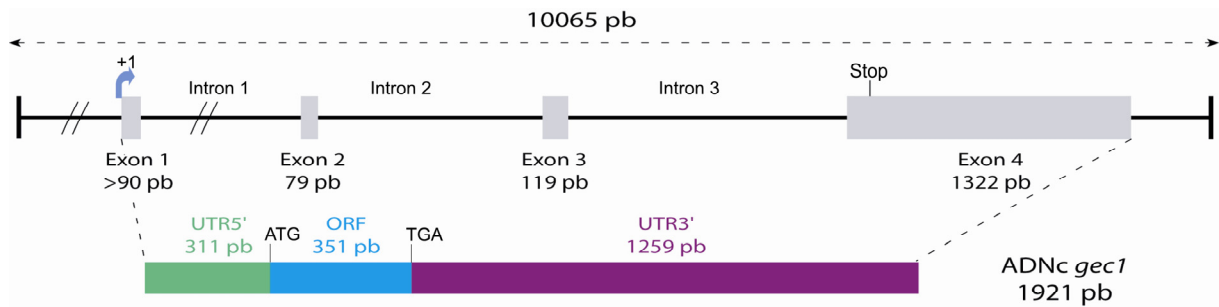


Figure 14 : Organisation du gène *gec1* de Cobaye et représentation de l'ADNc correspondant. L'initiation de la transcription est représentée par la flèche bleue (+1). Les positions des codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TGA) de la traduction sont indiquées. ORF, Open Reading Frame : UTR, UnTranslated Region. D'après Vernier-Magnin *et al* (2001).

Afin de comprendre cette régulation positive de *gec1* suite à une stimulation par E_2 , une analyse des séquences de *gec1* de Cobaye et des séquences flanquantes a permis d'identifier un ERE en position + 37 dans le premier exon (Figure 15). De plus, des expériences de transfections transitoires ont démontré que la séquence ERE permettait l'induction estrogénique *via* le récepteur $RE\alpha$ et non $RE\beta$ (Vernier-Magnin, *et al.*, 2005). Par la suite, le criblage d'une banque d'ADNc de placenta humain a permis d'identifier l'ADNc *gec1* humain de 1638 pb qui contient une séquence codante de 351 pb présentant 93% d'identité avec celle de l'ADNc *gec1* de Cobaye (Figure 16). Le gène *gec1* humain, localisé sur le chromosome 12, est constitué de 4 exons comme le gène *gec1* de Cobaye (Vernier-Magnin, *et al.*, 2001).

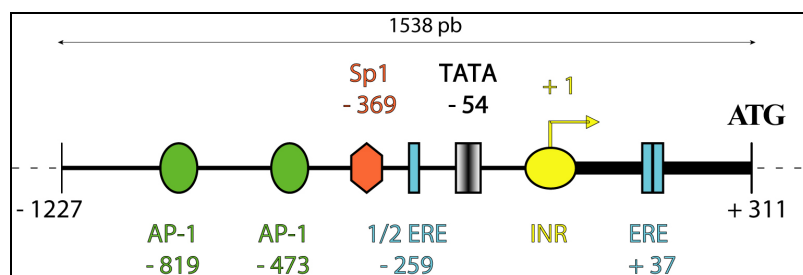


Figure 15 : Représentation du fragment d'ADN génomique de *gec1* de Cobaye de 1538 pb en amont de l'ATG. Les séquences régulatrices présentes dans le fragment sont indiquées. AP-1 : site de liaison de la protéine activatrice 1 ; ERE : Elément de Réponse aux Estrogènes ; INR : élément initiateur de la transcription ; Sp1 : site de liaison de la protéine SP1 ; TATA : boîte TATA.

Par ailleurs, les parties codantes des ADNc *gec1* humain et de Cobaye présentent respectivement 79% et 76,8% d'identité avec celle de l'ADNc *gabapap* humain ($GABA_A$ Receptor-Associated Protein) constitué de 924 pb (Figure 16). En revanche, les UTR 5' et 3'

des 2 ADNc *gecl* n'ont pas d'identité avec celles de *gabarap* (Figure 16). De plus, le gène *gabarap* se situe sur un chromosome différent de celui du gène *gecl* : le chromosome 17.

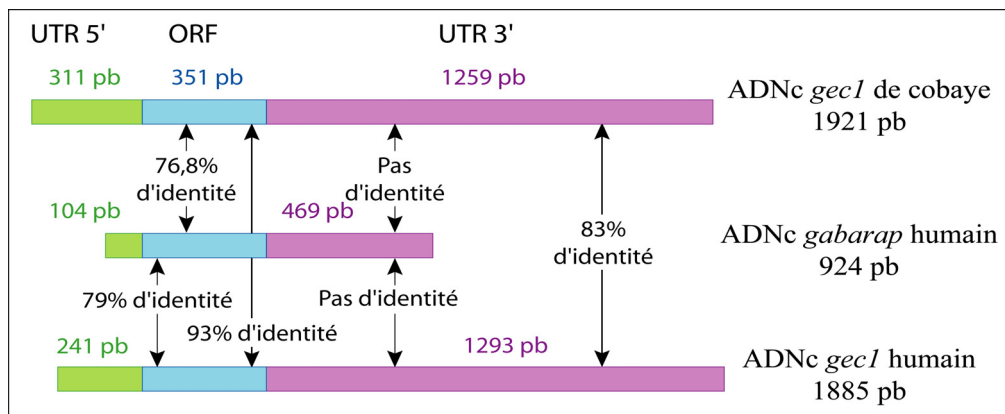


Figure 16 : Comparaison des séquences des ADNc *gecl* de Cobaye, *gabarap* humain et *gecl* humain. ORF, Open Reading Frame ; UTR, UnTranslated Region. D'après Vernier-Magnin et collaborateurs (2001).

L'absence d'identité entre les régions non traduites 3' (UTR 3', untranslated region 3') des gènes *gecl* et *gabarap* humains permet de détecter, grâce à des sondes spécifiques, l'expression différentielle de ces deux gènes. Ainsi, grâce à cette particularité, Nemos et collaborateurs ont montré une expression plus élevée de *gecl* dans le système nerveux central alors que *gabarap* est plus exprimé dans les tissus endocrines. Par ailleurs, dans ces travaux, il a été également démontré que l'expression des deux gènes, *gecl* et *gabarap*, apparaissait très faible dans plusieurs lignées cancéreuses (Nemos, *et al.*, 2003).

En ce qui concerne la protéine GEC1, elle présente 87% d'identité avec la protéine GABARAP (Wang, *et al.*, 1999). Les deux séquences protéiques de 117 amino acides sont présentées Figure 17.

```

GEC1 MKFQYKEDHPFEYRKKEGKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVPDLDRKYLVPDLTVGQF
GABARAP MKFVYKEEHPFEKRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARIGDLDKKKYLVPDLTVGQF

GEC1 YFLIRKRIHLRPEDALFFFVNNTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMYGL - 117
GABARAP YFLIRKRIHLRAEDALFFFVNNVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESVMYGL - 117

```

Figure 17 : Comparaison des séquences protéiques de GEC1 et de GABARAP. En rouge sont indiqués les acides aminés qui diffèrent de ceux présents dans la protéine GEC1.

De nombreux travaux ont été entrepris pour identifier les différents partenaires protéiques de GABARAP et de GEC1 afin de comprendre et de caractériser le rôle de ces

protéines. L'ensemble des partenaires de ces protéines, identifiés à ce jour, est présenté dans le Tableau III. Ainsi, l'identification de partenaires protéiques de GABARAP et de GEC1 permet de suggérer diverses propriétés de ces protéines ainsi que les fonctions cellulaires associées. A l'heure actuelle, GABARAP semble être un transporteur intracellulaire impliqué dans les mécanismes de signalisation cellulaire, d'endocytose et de dégradation protéique. GEC1 interagit avec certains partenaires communs à GABARAP. Ainsi cette protéine semble être impliquée, au moins en partie, dans les mêmes mécanismes. L'identification d'autres partenaires permettrait de mieux comprendre le rôle biologique de cette protéine.

Tableau III : Partenaires des protéines GEC1 et GABARAP. RE : réticulum endoplasmique ; ND : non déterminé.

	GEC1	GABARAP	Fonctions possibles de l'interaction	Références
Tubuline	oui	oui	transport du récepteur GABA _A ; transport de vésicules	(Wang et Olsen, 2000, Mansuy, <i>et al.</i> , 2004, Kouno, <i>et al.</i> , 2005)
Sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABA _A	oui	oui	transport et agrégation du récepteur GABA _A	(Wang, <i>et al.</i> , 1999, Mansuy, <i>et al.</i> , 2004)
Récepteur k aux opioïdes	oui	ND	transport et agrégation du récepteur k aux opioïdes	(Chen, <i>et al.</i> , 2006)
NSF	oui	oui	transport de vésicules; fusion membranaire	(Kittler, <i>et al.</i> , 2001, Chen, <i>et al.</i> , 2006)
ARH	oui	ND	endocytose médiée par la clathrine des récepteurs aux LDL	(Mameza, <i>et al.</i> , 2007)
ULK1	ND	oui	transport de vésicules; élongation axonale	(Okazaki, <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur à la transferrine	ND	oui	dégradation de protéines membranaires	(Green, <i>et al.</i> , 2002)
Géphyrine	ND	oui	organisation des récepteurs à neurotransmetteurs à la synapse	(Kneussel, <i>et al.</i> , 2000)
p130 / PRIP 1	ND	oui	assemblage du récepteur GABA _A	(Kanematsu et Hirata, 2002)
GRIP1	ND	oui	trafic et agrégation du récepteur GABA _A à la membrane	(Kittler, <i>et al.</i> , 2004)
DDX47	ND	oui	helicase à ARN responsable de l'épissage du pré-ARNm; rôle dans l'induction de l'apoptose	(Lee, <i>et al.</i> , 2005)
Chaîne lourde de la clathrine	ND	oui	intervient dans les processus d'endocytose	(Mohrluder, <i>et al.</i> , 2007)
Calréticuline	ND	oui	protéine chaperon dépendante du Ca ²⁺ ; protéine tampon du Ca ²⁺ dans le RE	(Mohrluder, <i>et al.</i> , 2007)

3. Modèles d'études des interactions ADN/protéine et protéines/protéines

3.1. Les modèles cellulaires

3.1.1 Criblage de xénoestrogènes

L'utilisation d'un modèle cellulaire permet d'identifier des composés estrogéniques potentiels tout en déterminant leur nature agoniste ou antagoniste. Un tel modèle présente une sensibilité et une spécificité accrues ainsi qu'un coût réduit par rapport à un modèle animal (Eertmans, *et al.*, 2003). Cependant, cette stratégie présente quelques limites par rapport à un modèle *in vivo*. En effet, une lignée cellulaire ne peut rendre compte du métabolisme d'un organisme entier, conduisant à la détection de faux négatifs (Gray, *et al.*, 2002). Ainsi, une molécule inactive *in vitro* peut être métabolisée en un composé estrogénique actif *in vivo*.

Il existe deux stratégies cellulaires distinctes permettant l'identification de molécules potentiellement estrogéniques. L'une d'elle consiste à étudier l'effet d'une molécule sur la prolifération cellulaire. L'autre est basée sur la transfection de cellules par un gène rapporteur.

Pour l'étude de la prolifération cellulaire, la lignée MCF-7 est utilisée parce qu'elle est connue pour croître et se diviser sous l'effet des estrogènes (Lazennec, *et al.*, 1999), molécules servant de référence. Cette approche est une des plus sensibles pour identifier un composé estrogénique (Rasmussen et Nielsen, 2002). Cependant, les différences de culture et de conservation des clones entraînent diverses évolutions cellulaires. De ce fait, les résultats obtenus peuvent varier d'un laboratoire à un autre (Zacharewski, 1998).

L'utilisation d'un gène rapporteur permet de détecter le niveau d'expression génique suite à l'activation du RE. Cette stratégie repose sur l'utilisation soit de cellules de mammifères (MCF-7, T47D, COS1...) soit de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) transfectées par un plasmide contenant un ou plusieurs ERE en amont d'un gène rapporteur

(*luciférase* ou *β -galactosidase*) (Metzger, *et al.*, 1988, Gaido, *et al.*, 1997, Hoogenboom, *et al.*, 2001). Il est à noter que l'utilisation d'un modèle cellulaire dépourvu de RE α ou de RE β (levure ou cellules de mammifères) nécessite la cotransfection par un vecteur codant ces protéines.

3.1.2 Identification de partenaires protéiques

La mise en évidence d'interactions protéines/protéines dans un modèle cellulaire peut être réalisée soit par double hybride dans des levures ou des cellules de mammifères (Fields et Song, 1989) soit par co-immunoprécipitation.

La technique de double hybride repose sur l'utilisation d'une protéine fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription (GAL4 par exemple) et d'une autre protéine fusionnée avec le domaine transactivateur d'un facteur de transcription (GAL4 par exemple). Une interaction entre les deux protéines d'intérêt entraîne un rapprochement des deux domaines du facteur de transcription, engendrant ainsi la transactivation d'un gène rapporteur.

La co-immunoprécipitation est consistante à utiliser des anticorps dirigés contre une protéine d'intérêt et couplés à des billes de sépharose. Après biorecognition antigène/anticorps, une étape de centrifugation permet de précipiter les complexes anticorps/antigènes/partenaire(s).

3.2. Les biocapteurs

Il existe à l'heure actuelle deux types de puce permettant l'étude d'interaction de molécules biologiques : l'une nécessitant un marquage préalable par fluorescence par exemple (puce Afimetrix...), l'autre sans marquage préalable. Nous nous intéresserons ici à la deuxième stratégie. Pour suivre des interactions moléculaires en temps réel et en absence de marquage, de nombreux capteurs ont été conçus. Certains d'entre eux reposent sur la mesure d'une variation d'indice de réfraction comme l'interférométrie ou la résonance plasmonique de surface (SPR). D'autres sont basés sur une mesure gravimétrique, c'est le cas des capteurs

à microbalances à quartz (QCM) ou de ceux à ondes acoustiques de surface (SAW). Notre étude étant basée sur la technologie SPR, nous ne développerons que cette approche. Par ailleurs, il existe un grand nombre d'appareils commerciaux, ou non, utilisant la SPR pour quantifier les interactions biologiques. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés aux biocapteurs SPR reposant sur le système développé par la société BIAcore[®] (GE, Healthcare Life Sciences). Il est à noter que nous avons choisi de nommer « puce » les surfaces permettant l'agencement des biocapteurs (ex puce d'or, puce CM5...). Les biocapteurs correspondent, dans ce rapport, aux puces sur lesquelles nous avons greffé des molécules biologiques (phospholipides, ADN, protéines).

3.2.1 La résonance plasmonique de surface (SPR)

La SPR est une technique optique qui repose sur l'oscillation de densité de charge qui existe à l'interface de deux milieux présentant des constantes diélectriques de charges opposées comme par exemple un métal et un milieu diélectrique (Homola, *et al.*, 1999). Lorsqu'un rayon de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre ces deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. L'utilisation d'un prisme, permet à la lumière polarisée d'être totalement réfléchi (Kretschmann et Raether, 1968, Otto, 1968). Dans ces conditions, une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent. Le prisme est en contact avec une surface de verre recouverte d'une fine couche de métal, elle-même en contact avec un système fluide véhiculant la solution contenant les analytes (milieu biologique) (Figure 18A). Il est à noter que différents métaux ont été étudiés afin d'optimiser la sensibilité des capteurs, il en résulte que l'argent confère au capteur la meilleure sensibilité, mais celui-ci est très facilement oxydable en milieu aqueux. L'or,

beaucoup plus stable, est donc le meilleur métal pour un capteur biologique (Lecaruyer, *et al.*, 2007).

Dans ces conditions, les électrons libres de la couche périphérique de l'or entrent en résonance avec l'onde évanescente, ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface. Le faisceau réfléchi présente alors une chute d'intensité à un angle défini appelé angle de résonance (Figure 18B). Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent donc, ici, l'indice de réfraction du milieu biologique.

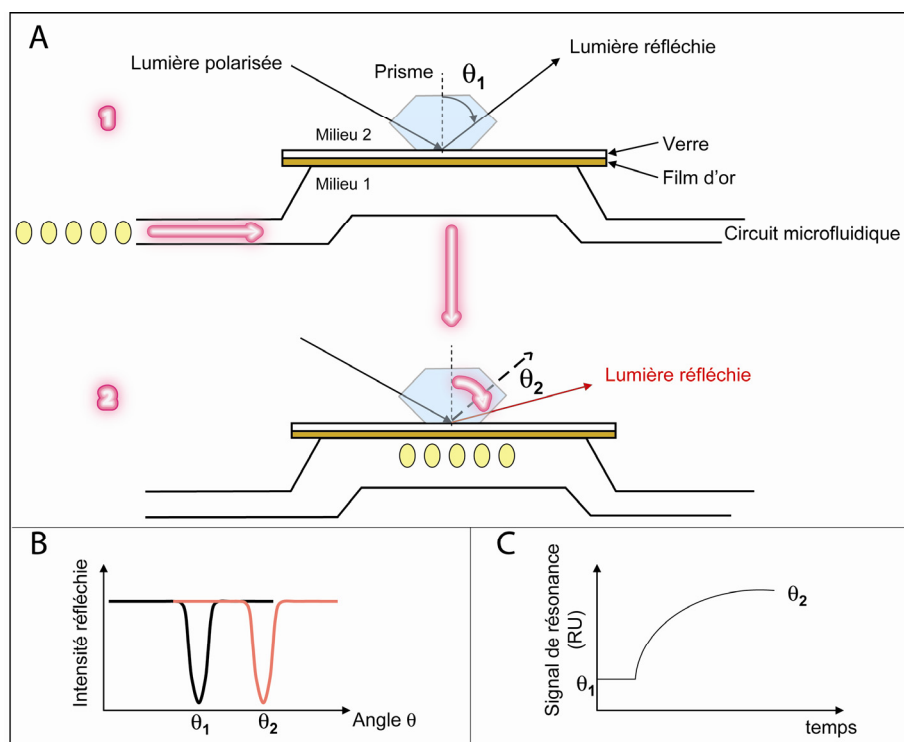


Figure 18 : Représentation schématique de la détection d'interaction par SPR. (A) La lumière polarisée est collimatée à l'interface verre/or *via* le prisme, la totalité de la lumière est réfléchi selon un angle θ_1 (étape 1). Les analytes injectés (en jaune) *via* le circuit microfluidique interagissent avec le film d'or, la lumière est alors réfléchi selon un angle θ_2 (étape 2). **(B)** La variation d'angle est détectée par l'appareil, puis **(C)** convertie en signal de réponse en fonction du temps.

Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation de complexes à la surface de la biopuce modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance (Figure 18). Ainsi, il a été établi, de façon empirique, une corrélation entre la variation d'angle et celle de masse de molécules déposées sur la puce [$\Delta\theta=0,1^\circ \Leftrightarrow 1\text{ng/mm}^2$]

et, de façon théorique, une corrélation entre la variation d'angle et l'épaisseur de la couche moléculaire [$\Delta\theta=0,07^\circ \Leftrightarrow 1\text{nm}$] (Stenberg, *et al.*, 1991, Sigal, *et al.*, 1997).

3.2.2 Exemples d'application

La SPR a ouvert une nouvelle voie d'étude des interactions macromoléculaires en temps réel. La haute sensibilité de cette technologie permet d'étudier des interactions moléculaires faisant intervenir des partenaires de tailles et de natures différentes : oligosaccharides, ADN, protéines, lipides ou virus. En règle générale, lors des études SPR, on nomme ligand l'espèce immobilisée à la surface du biocapteur et analyte la molécule injectée *via* la cartouche microfluidique. Cependant, afin d'éviter toute confusion avec les molécules potentiellement estrogéniques, appelées ligands des RE, nous nommerons, dans ce présent rapport, analytes les molécules injectées et cibles les molécules immobilisées à la surface du capteur.

La détection en temps réel des interactions permet de déterminer les cinétiques d'interactions, les constantes d'association et de dissociation et ainsi de déterminer l'affinité des analytes pour leurs cibles. Toutefois, ces outils ne peuvent être limités à une étude de cinétiques d'interactions. En effet, ces biocapteurs peuvent avoir des applications quantitatives (mesure de concentration active, détermination de la quantité de molécules immobilisées et/ou capturées) ou qualitatives (criblage de molécules, purification de partenaires...) (Rich et Myszka, 2000). On peut citer comme exemples les travaux axés sur la détection de perturbateurs endocriniens dans l'eau (Sesay et Cullen, 2001, Habauzit, *et al.*, 2007, Habauzit, *et al.*, 2008) ou ceux qui ont permis d'établir un couplage « BIA-MS » (BIAcore® – spectromètre de masse) (Krone, *et al.*, 1997, Nelson, *et al.*, 1999, Nelson et Krone, 1999, Boireau, *et al.*, 2008). Cette dernière approche, dite de « fishing », oriente donc l'utilisation des biocapteurs vers l'identification de marqueurs biologiques dans une démarche

ultime de diagnostic (Nedelkov et Nelson, 2001). La mise en place d'une telle stratégie nécessite de disposer d'un anticorps capable de reconnaître spécifiquement le biomarqueur avec une affinité accrue. Pour déterminer avec précision l'immunoglobuline la plus appropriée, une approche quantitative *via* un capteur SPR, peut être mise en place. Celle-ci permet de déterminer les données cinétiques ainsi que les constantes d'équilibres des interactions antigènes/anticorps (Kramer, *et al.*, 2008).

3.2.3 Différentes surfaces de puce

Il existe trois stratégies différentes permettant l'immobilisation de cibles à la surface d'un biocapteur : l'utilisation d'une puce d'or nu, de surfaces tridimensionnelles constituées de polymères fonctionnalisés, ou bidimensionnelles composées de molécules organisées en monocouches. L'or nu permet un autoassemblage de molécules pourvues de fonctions thiols. Le choix d'une telle surface entraîne la détection d'un grand nombre d'interactions non spécifiques résultant de l'adsorption des analytes sur le support métallique. Une étape de « passivation » de la surface est donc indispensable pour réduire ce phénomène (Rella, *et al.*, 2004). Ainsi, il est possible d'étudier l'interaction d'un analyte (protéine ou acide nucléique) avec une cible ADN. L'immobilisation de cibles protéiques par adsorption passive engendre leur dénaturation et réduit ainsi la spécificité d'interaction des analytes (Butler, *et al.*, 1993). Cependant, la présence d'une cystéine unique à la surface de la protéine cible permet l'autoassemblage orienté de celle-ci et empêche sa dénaturation (Aoyagi, *et al.*, 2008). Les deux autres stratégies de greffage des cibles utilisant diverses molécules capables de masquer la surface métallique de la puce vont permettre de limiter ce phénomène d'adsorption aspécifique.

3.2.3.1 Les surfaces tridimensionnelles (Dextran)

3.2.3.1.1 Description

Au début de années 90, les premières biopuces développées étaient recouvertes d'un hydrogel composé de Carboxyméthyl-Dextran (CMD) lié de façon covalente au support (Löfas et Johnsson, 1990). Ce polymère permet une immobilisation des cibles *via* différentes fonctions chimiques (-NH₂, -SH, -CHO, -OH, -COOH). Il existe plusieurs modèles de biopuces développées par BIAcore[®] reposant sur l'utilisation de ce polymère, à savoir les CM5, CM4 et CM3 qui diffèrent par la densité de groupement carboxyméthyl ou par l'épaisseur de l'hydrogel à la surface de la puce (Figure 19).

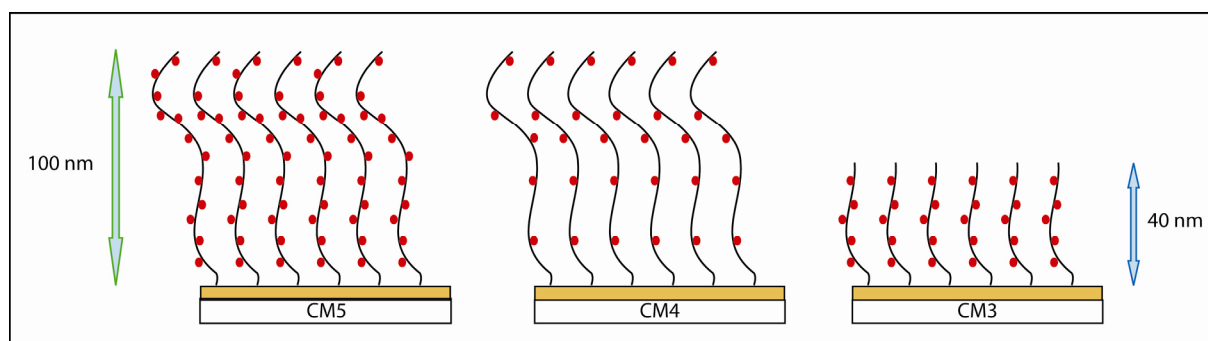


Figure 19 : Représentation schématique des biopuces carboxyméthyl-dextran. La biopuce CM4 diffère de la CM5 par sa densité de groupements carboxyméthyls (en rouge). La puce CM3 présente une densité de groupements d'ancrages identique à celle des CM5, mais l'épaisseur d'hydrogel est plus faible. Les flèches de couleur représentent l'épaisseur des polymères de dextran.

Parallèlement à la commercialisation de ces puces CMD, la société BIAcore[®] a développé d'autres surfaces basées sur l'utilisation de cet hydrogel. En effet, afin de répondre aux attentes variées des utilisateurs, les puces SA, L1 et NTA ont fait leur apparition sur le marché (Figure 20). La puce SA permet une bio-reconnaissance de molécules biotinylées grâce à son polymère de CMD couplé à de la streptavidine. La biopuce L1 permet, quant à elle, d'immobiliser des molécules et des structures lipidiques *via* des liaisons hydrophobes grâce à la présence de chaînes carbonées couplées au CMD. Les étiquettes protéiques hexahistidines sont reconnues par les puces de type NTA, grâce à des groupements nitrilotriacétiques liés de façon covalente au CMD.

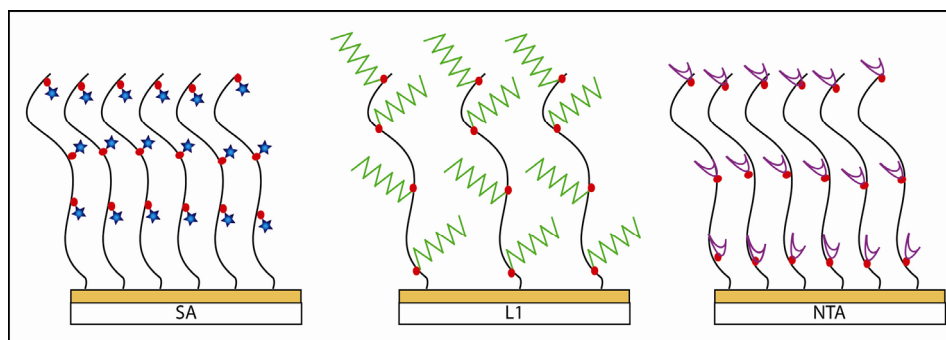


Figure 20 : Représentation schématique des biopuces SA et L1. La puce SA est constituée d'un polymère de dextran couplé à des groupements carboxyméthyls (en rouge) permettant la liaison de molécules de streptavidine (en bleu). La puce L1 est composée de groupes lipophiles (en vert) liés de façon covalente à un polymère de dextran *via* des groupements carboxyméthyls (en rouge). La puce NTA présente des acides nitrilo-triacétiques (en violet) liés à l'hydrogel CMD. Les hauteurs des gels de dextran ne sont pas représentées sur cette figure car elles ne sont pas divulguées par BIAcore®.

3.2.3.1.2 Avantages et inconvénients

La présence de dextran à la surface de ces puces rend théoriquement inaccessible le support métallique, empêchant ainsi l'adsorption aspécifique des analytes de nature protéique. De plus, l'organisation tridimensionnelle permet, si besoin est, d'immobiliser un grand nombre de cibles (Liedberg, *et al.*, 1993).

Cependant, ce type de surface, en particulier les polymères de dextran, présente aussi certains inconvénients. La profondeur du champ évanescent est de 300 nm et son intensité décroît de façon exponentielle plus on s'éloigne de la surface. L'utilisation d'un hydrogel favorise l'interaction cible/analyte de la surface du gel. Or, comme la sensibilité de détection est optimale à la surface de l'or, l'utilisation d'une telle biopuce engendre une perte de sensibilité corrélée à la hauteur de gel. Les interactions moléculaires à la surface et à l'intérieur de la matrice de dextran sont aussi perturbées par un phénomène appelé transport de masse résultant d'un problème de diffusion des analytes à travers le gel. Au début de l'injection, la concentration en analyte à la surface de la matrice est supérieure à celle à l'intérieur de l'hydrogel. L'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur de la matrice nécessite donc un laps de temps, dépendant de la hauteur de gel, ce qui a pour conséquence une

perturbation des mesures cinétiques. Ce biais a un impact d'autant plus grand que l'interaction moléculaire étudiée est rapide (Schuck, 1996, Yarmush, *et al.*, 1996, Sadana, 2001).

Le fait d'avoir une structure tridimensionnelle engendre aussi un manque de contrôle dans l'orientation des cibles, ce qui introduit là encore un biais dans la bio-reconnaissance des analytes. Cette structure peut aussi engendrer des problèmes d'accessibilité des cibles confinées dans l'hydrogel. Par ailleurs, ces types de surface sont connus pour induire un phénomène de capture multiple ou « rebinding » conduisant à des artéfacts dans les mesures des constantes cinétiques (Fong, *et al.*, 2002).

Enfin, ce type de biocapteur capable de fixer une grande quantité de cibles (Yang, *et al.*, 2007) présente un avantage si l'utilisateur souhaite capturer un grand nombre d'analytes. Cependant, cette forte densité de cibles peut avoir pour conséquence l'apparition d'interactions non spécifiques ou entraîner l'apparition d'encombrement stérique influant sur l'interaction étudiée. En ce qui concerne les expériences de « fishing », la grande capacité de capture de ce type de surface peut présenter un avantage, à la condition que la molécule capturée soit éluée de la surface de la puce avant l'analyse par spectrométrie de masse. Si le couplage BIA-MS est orienté vers une digestion trypsique *in situ* (directement sur la puce), la présence du polymère de dextran peut générer des artéfacts dans la fenêtre des bas poids moléculaires dans un spectre de masse.

3.2.3.2 Les surfaces bidimensionnelles

3.2.3.2.1 Description

Ce type de surface est organisé en une monocouche de molécules de natures variées permettant l'ancrage des cibles *via* des liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques. Le greffage de ces monocouches à la surface des puces d'or peut se faire selon diverses stratégies. Par exemple, Gobbi et collaborateurs ont créé, par physisorption, une monocouche d'ovalbumine conjuguée à l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (Figure 21) permettant la

détection de cet herbicide par un anticorps (Gobi, *et al.*, 2007b). D'autres équipes se sont intéressées à une stratégie de chimisorption comme par exemple l'électropolymérisation de polypyrroles (Figure 21) préalablement couplés aux molécules cibles qui peuvent être de nature protéique (Grosjean, *et al.*, 2005) ou nucléotidique (Maillart, *et al.*, 2004).

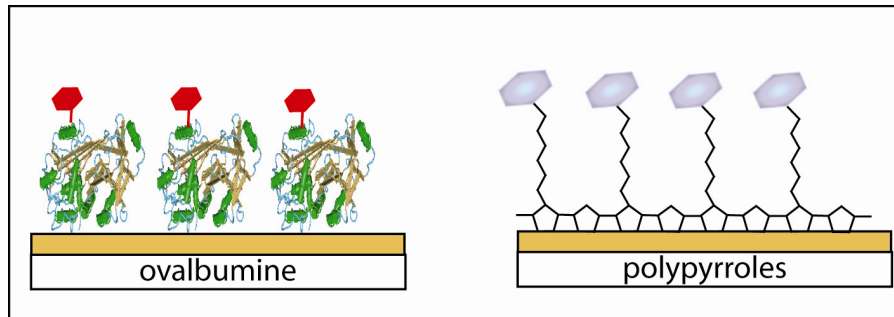


Figure 21 : Représentation schématique de monocouches d'ovalbumine et de polypyrroles. L'ovalbumine peut être conjuguée à une petite molécule comme l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (en rouge) (Gobi, *et al.*, 2007b). Une partie des pyrroles est préalablement couplée à la molécule cible (en bleu). L'échelle de cette figure n'est pas représentative.

Il existe aussi un autre type de chimisorption qui repose sur les propriétés de couplage de molécules thiolées à la surface de l'or. Cette réaction permet la mise en place de monocouches dite autoassemblées (SAM). Les premières SAM élaborées sur couche d'or à l'aide de chaînes carbonées thiolées ont été développées dans les années 80 (Nuzzo et Allara, 1983, Bain et Whitesides, 1988, Laibinis, *et al.*, 1989). A l'heure actuelle, les SAM sont utilisées dans des domaines de compétence très variés comme la microlithographie (Berggren, *et al.*, 1995), la nanoconstruction (Lahav, *et al.*, 2006), l'électronique moléculaire (Chaki et Vijayamohanan, 2002), mais aussi la biochimie (Mrksich et Whitesides, 1996, Sigal, *et al.*, 1996).

La société BIAcore[®] commercialise les puces HPA (Figure 22) qui présentent une SAM hydrophobe sur laquelle des liposomes peuvent fusionner, permettant ainsi la mise en place de bicouches lipidiques hybrides. Les puces C1 carboxyméthylées (Figure 22) permettent l'immobilisation de molécules *via* des fonctions -NH₂, -SH, -CHO, -OH ou -COOH.

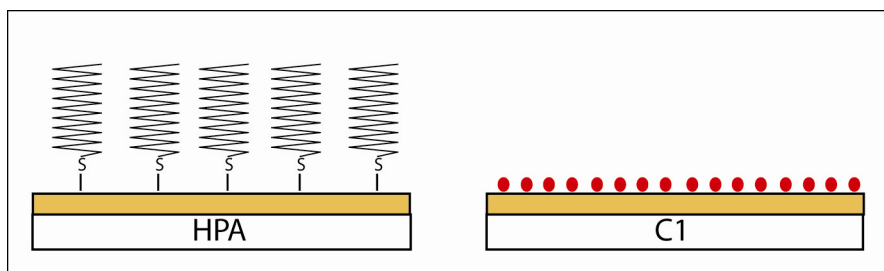


Figure 22 : Représentation schématique des SAM commercialisées par BIAcore®. La puce HPA est constituée d'une SAM de chaînes carbonées hydrophobes. La puce C1 possède des groupements carboxyméthyls (en rouge) immobilisés directement sur la surface d'or. L'échelle de cette figure n'est pas représentative.

On trouve aussi une multitude de SAM développées par différentes équipes de recherche comme par exemple celles composées de PolyEthylène Glycol (PEG) thiolés (Gobi, *et al.*, 2007a, Satomi, *et al.*, 2007) (Figure 23). D'autres auteurs ont aussi utilisé des surfaces fonctionnalisées avec des Oxydes de PolyEthylène (PEO) (Silin, *et al.*, 1997, Frederix, *et al.*, 2004), ou des PolyEthylénImines (PEI) (Cui, *et al.*, 2005, Mannelli, *et al.*, 2007). Certains travaux sont basés sur l'utilisation d'espacesurs bifonctionnels permettant la fixation de cibles de nature protéique ou nucléotidique (Maillart, *et al.*, 2004, Boireau, *et al.*, 2005a, Mansuy-Schlick, *et al.*, 2006).

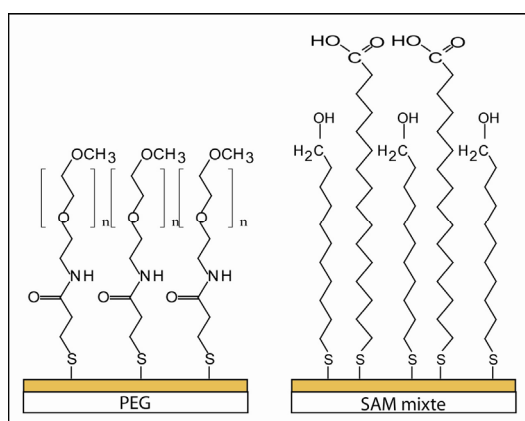


Figure 23 : Exemples de SAM non commerciales. Les PEG thiolés sont un exemple de polymère dont l'immobilisation à la surface de la puce peut être contrôlée par l'expérimentateur. Ils peuvent être remplacés par des PEO ou des PEI. La SAM dite mixte présentée ici est constituée de 11-mercapto-1-undécanol et d'acide 16-mercaptohexadécanoïque.

Briand et collaborateurs se sont intéressés à des SAM dites mixtes, composées d'acide 11-mercaptoundécanoïque associé avec d'autres thiols de différentes longueurs et présentant différentes fonctions chimiques (-CH₃, -OH ;) (Briand, *et al.*, 2006). D'autres équipes de

recherche ont développé une stratégie de SAM mixte constituée de 11-mercapto-1-undécanol et d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (Figure 23) (Frederix, *et al.*, 2003, Park, *et al.*, 2004, Huang, *et al.*, 2005).

3.2.3.2.2 Avantages et inconvénients

Les monocouches bidimensionnelles confèrent quelques avantages, comme l'immobilisation des cibles au voisinage de la surface du capteur dans la zone d'intensité maximale du plasmon (Figure 24). Le fait que les molécules ne soient pas réparties tridimensionnellement dans un hydrogel mais disposées directement à la surface de la puce permet, d'une part, de s'affranchir du phénomène de transport de masse et, d'autre part, confère une meilleure accessibilité des cibles par les analytes (Yang, *et al.*, 2007).

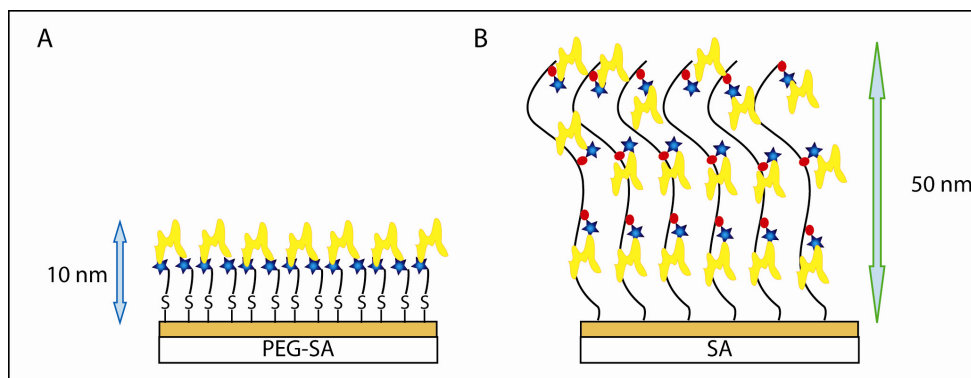


Figure 24 : Exemple de représentation schématique de surfaces di et tridimensionnelle. (A) Monocouche de biotine (en jaune) immobilisée *via* une SAM de PEG biotinylés couplés à de la streptavidine (en bleu). **(B)** Immobilisation de biotine (en jaune) sur une puce SA (BIAcore[®]) constituée de streptavidine (en bleu) immobilisée dans un hydrogel de dextran de 50 nm *via* un groupement carboxyméthyl (en rouge). D'après Yang et collaborateurs (2007).

De plus, de récentes études ont montré que l'utilisation d'une SAM mixte constituée d'acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque et de 11-mercapto-1-undécanol permettait un bon couplage de molécules *via* les fonctions carboxyliques, tout en limitant l'adsorption non spécifique *via* les fonctions hydroxyles (Frederix, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2005). Cette même surface permet aussi un contrôle de la densité de cibles en modulant la proportion des molécules d'ancrage. Ainsi, un meilleur contrôle de cette densité tend à réduire l'encombrement stérique.

En conclusion, le greffage de cibles *via* une monocouche bidimensionnelle augmente à la fois la sensibilité de la détection et la spécificité de l'interaction étudiée (Nieba, *et al.*, 1997, Shriver-Lake, *et al.*, 1997, Frederix, *et al.*, 2003, Boireau, *et al.*, 2005b, Mansuy-Schlick, *et al.*, 2006, Yang, *et al.*, 2007).

Les monocouches de PEG et de PEO sont, elles aussi, très efficaces dans la réduction de l'adsorption non spécifique des partenaires biologiques (protéines, cellules...) à la surface de la puce (Prime et Whitesides, 1991, Silin, *et al.*, 1997, Elbert et Hubbell, 1998, Ruiz-Taylor, *et al.*, 2001, Frederix, *et al.*, 2004). Les surfaces couvertes de PEI permettent d'immobiliser une cible *via* des interactions électrostatiques et empêchent l'adsorption non spécifique des protéines basiques (Cui, *et al.*, 2005).

En revanche, une organisation bidimensionnelle limite le nombre de cibles immobilisées (Yang, *et al.*, 2007) sur la puce, réduisant ainsi la capacité de capture des analytes. Ceci peut être préjudiciable dans le cas où ceux-ci ne sont qu'en très faible quantité dans l'échantillon injecté alors que l'objectif de l'expérience est de capturer un maximum d'analytes sur la puce.

En conclusion, le choix du type de surface constitue une étape critique qui dépend de l'objectif visé par l'expérimentateur.

3.2.4 Les capteurs ADN/protéine

Un grand nombre de protéines est capable d'interagir avec l'ADN afin de moduler l'expression de gènes cibles, impliqués dans le contrôle de grandes fonctions biologiques (développement, reproduction, métabolisme, immunité, croissance et différenciation cellulaires ; cf. paragraphes 1.2.1, 1.2.3 et 2.2). Un défaut dans la régulation des interactions de ces facteurs de transcription avec l'ADN est donc susceptible d'engendrer différentes pathologies. L'étude de ces interactions et de leurs régulations permet d'identifier aussi bien de nouvelles cibles que de nouvelles molécules thérapeutiques impliquées dans le traitement

de certaines réactions inflammatoires, troubles métaboliques et cancers (Gronemeyer, *et al.*, 2004, Gniazdowski, *et al.*, 2005, D'Incalci, *et al.*, 2007).

Depuis une trentaine d'années, ces interactions sont le plus souvent étudiées par des expériences de retard sur gel (EMSA) ou d'empreinte à la DNase (DNase footprinting) (Galas et Schmitz, 1978, Fried et Crothers, 1981, Fried, 1989). Contrairement à la SPR, ces techniques nécessitent des quantités importantes de matériel biologique, un marquage préalable et surtout elles ne permettent pas l'analyse cinétique précise de l'interaction étudiée.

La mise en place de biocapteurs SPR destinés à étudier ces interactions est organisée en deux grandes étapes : l'immobilisation des cibles ADN sur une surface judicieusement choisie, puis la confrontation du partenaire protéique purifié. Cui et collaborateurs ont choisi d'immobiliser une séquence nucléotidique *via* une interaction électrostatique à l'aide d'une monocouche de PEI chargés positivement afin d'étudier l'interaction de protéines histones avec l'ADN (Cui, *et al.*, 2005). Mannelli et collaborateurs ont utilisé les PEI pour immobiliser de l'extravidine permettant une fixation de molécules biotinylées. Selon ces auteurs, cette stratégie originale permet de suivre avec précision des hybridations spécifiques d'ADN (Mannelli, *et al.*, 2007). Dans le cadre de l'étude d'interactions entre une protéine et une séquence nucléotidique, une forte densité d'ADN à la surface de la puce peut entraîner une augmentation de l'aspécificité ou de l'encombrement stérique, perturbant ainsi la détection de l'interaction. Maillart et collaborateurs ont, quant à eux, utilisé de petites séquences nucléotidiques appelées séquences Zip, immobilisées sur une monocouche de polypyrroles, permettant une hybridation spécifique de séquences nucléotidiques d'intérêts (Maillart, *et al.*, 2004). Cette approche permet d'immobiliser rapidement et spécifiquement plusieurs oligonucléotides en vue d'étudier l'impact de la séquence sur la liaison de la protéine étudiée. Nos travaux avaient pour but l'identification de molécules capables de moduler l'interaction

du RE avec sa cible ERE. Ne souhaitant pas immobiliser plusieurs ERE différents, nous ne développerons donc pas d'avantage ces différents travaux.

En revanche, la plupart des équipes étudiant l'interaction du RE avec l'ADN ont orienté leurs stratégies d'immobilisation d'ADN vers une bio-reconnaissance avidine / biotine fixée de façon covalente à la surface *via* une matrice de dextran (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Asano, *et al.*, 2004, Habauzit, *et al.*, 2008), ou *via* une monocouche mixte PEG-biotinylée / mercapto-undécanol (Su, *et al.*, 2006, Peh, *et al.*, 2007, Teh, *et al.*, 2007).

Nous avons choisi de développer une approche permettant une meilleure maîtrise de l'environnement global des biocapteurs. En effet, il est essentiel de pouvoir contrôler la densité, ainsi que l'orientation des cibles à la surface du capteur. Nous avons donc, pour cela, orienté nos travaux sur l'autoassemblage moléculaire.

3.2.5 Les capteurs protéines/protéines

La grande majorité des protéines n'est pas impliquée dans des mécanismes d'interaction avec l'ADN. En effet, les protéines interagissent entre elles afin de remplir différentes fonctions comme le maintien de l'architecture de la cellule (actine, tubuline), l'adhérence cellulaire (cadhérines...), le transport intracellulaire (GEC1, GABARAP...), la signalisation (MAPK...), l'immunité (CMH...) ...

Afin de mettre en évidence des interactions protéines/protéines, il existe principalement trois méthodes : la GST pull-down, la co-immunoprécipitation et le double hybride. Les deux premières techniques sont assez onéreuses et « consomment » des quantités importantes de protéines (protéines de fusion, anticorps, extrait cellulaire ou tissulaire), puis nécessitent une étape de visualisation du résultat par électrophorèse SDS-PAGE et/ou par Western Blotting. La technique de double hybride a été initialement développée pour confirmer des interactions protéines/protéines entre deux partenaires connus (Fields et Song, 1989). Il est toutefois possible de l'appliquer à l'identification de partenaires par criblage de

banques d'expression. Cependant, en plus d'être fastidieuse, cette technique peut donner des résultats erronés (faux positifs, faux négatifs) (Legrain, *et al.*, 1994). Enfin, ces techniques ne permettent pas de déterminer la cinétique de la réaction étudiée, contrairement à la SPR.

La mise au point d'un biocapteur destiné à l'étude des interactions protéines/protéines est organisée en deux grandes étapes : l'immobilisation de la cible protéique, puis la confrontation du partenaire purifié, ou non. L'immobilisation peut se faire *via* une liaison directe avec le biocapteur (Mansuy-Schlick, *et al.*, 2006, Mohrluder, *et al.*, 2007) ou par l'intermédiaire d'un anticorps (Snopok, *et al.*, 2006). Quelle que soit la stratégie choisie, la surface du biocapteur peut présenter une architecture bidimensionnelle (Mansuy-Schlick, *et al.*, 2006, Snopok, *et al.*, 2006) ou tridimensionnelle (Mohrluder, *et al.*, 2007).

Notre équipe a développé en 2006 un capteur destiné à la caractérisation des interactions de la protéine GEC1 avec divers partenaires. Ces travaux ont permis de visualiser une interaction de la protéine de fusion GST-GEC1 avec la tubuline. L'immobilisation directe à la surface du biocapteur de la protéine de fusion par liaison covalente offre une sensibilité et une stabilité bien supérieures à celles conférées par une architecture tridimensionnelle impliquant un anticorps (Mansuy-Schlick, *et al.*, 2006). Cependant, le fait d'utiliser une protéine fusionnée à la GST (Gluthation S-Transférase) peut perturber la reconnaissance de la protéine par les partenaires. En effet, la fusion d'une protéine de 26 kDa avec une protéine d'intérêt peut avoir un impact sur la conformation de celle-ci. La GST peut aussi générer un encombrement stérique empêchant ainsi la liaison d'un partenaire éventuel. Enfin, la GST seule peut être reconnue par diverses protéines générant ainsi des faux positifs. Afin de s'affranchir de ces artefacts, il faut soit étudier en parallèle les protéines GST, GST-GEC1 et GEC1-GST, donc disposer des trois constructions, soit utiliser la protéine native ou fusionnée avec une ou plusieurs étiquettes de petites tailles.

CADRE ET BUT DU TRAVAIL

La ménopause est un processus naturel résultant d'un arrêt de la production de E₂ qui survient progressivement chez les femmes vers l'âge de 51 ans. Cette perturbation hormonale engendre différents symptômes. Ainsi, les femmes ménopausées peuvent présenter des dysfonctionnements physiologiques (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale) et ont des risques accrus de maladies osseuses, cardiovasculaires ou neurodégénératives (McEwen et Alves, 1999, Dhandapani et Brann, 2002). Par ailleurs, l'espérance de vie dans nos sociétés ne cesse d'augmenter, sans que l'âge d'apparition de la ménopause soit modifié : elle occupe plus du tiers de la vie des femmes qui présentent ainsi une carence hormonale sur une plus longue période, favorisant l'apparition de ces pathologies.

La stratégie thérapeutique développée consiste à remplacer E₂ endogène par un Traitement Hormonal Substitutif (THS) à l'aide d'hormones synthétiques ou naturelles. Cependant, cette thérapeutique très efficace à court terme présenterait à long terme des effets secondaires comme le développement de cancers hormonodépendants (sein, utérus) (Rossouw, *et al.*, 2002). De ce fait, l'utilisation de ce THS est remise en question et il apparaît nécessaire d'identifier de nouvelles molécules capables de moduler spécifiquement l'activité transcriptionnelle des RE en fonction du tissu afin de développer une thérapie de substitution. Ces molécules, en interagissant avec les RE, permettent une régulation de la transcription aboutissant à des effets bénéfiques dans certains tissus (cerveau, os), sans produire d'effets néfastes dans d'autres (sein, utérus) (Delmas, *et al.*, 1997, Jordan et Morrow, 1999, Dhandapani et Brann, 2002). Par ailleurs, des analyses épidémiologiques ont montré que les populations asiatiques qui consomment abondamment du soja présentent un plus faible risque de développer des cancers hormonodépendants (sein, prostate) que les populations occidentales (Adlercreutz, 2002a). Certaines études ont pris en compte les modifications éventuelles du comportement alimentaire des asiatiques en cas de migration. Il en résulte que, si les sujets conservent leurs habitudes alimentaires, le risque de développer un cancer reste

inchangé alors que lorsqu'ils adoptent l'alimentation occidentale, le risque d'apparition de cette pathologie augmente (Knight et Eden, 1995, Adlercreutz, 2002a). Les femmes asiatiques souffrent moins d'ostéoporose que les femmes européennes et américaines.

Par ailleurs, des études cliniques ont montré que des traitements de substitution des estrogènes engendraient une neuroprotection vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer et des accidents vasculaires cérébraux (Wise, *et al.*, 2001, Amantea, *et al.*, 2005).

L'utilisation des phytoestrogènes (*via* l'alimentation et /ou la pharmacopée) pourrait donc être à la fois une alternative au THS classique, une stratégie potentialisant les effets de la chimiothérapie (CHOP), un moyen de réduire les conséquences des pathologies neurodégénératives, et surtout une stratégie prévenant le développement de certains cancers.

Par ailleurs, l'identification et la détection de perturbateurs endocriniens d'origine synthétique (médicaments, polluants industriels, cosmétiques) ou naturelle (ZEA) permettraient, dans une démarche écologique et sanitaire, de réduire l'utilisation de certaines molécules, de développer des stratégies de collecte et d'élimination des déchets plus spécialisées, d'optimiser les conditions de stockage des céréales et d'éloigner, si besoin, les populations des zones à risques.

En conclusion, un criblage de molécules capables de lier les RE et de moduler l'expression de gènes cibles apporte un intérêt thérapeutique (THS, cancer, maladies neurodégénératives) et des applications dans les domaines de la santé publique et de l'écologie (perturbateurs endocriniens).

L'activité estrogénique d'un composé est souvent analysée par des études de prolifération de cellules de cancer du sein, des études de la croissance utérine chez le rongeur ou encore par la technique de transfection cellulaire à l'aide de vecteurs rapporteurs. Ces techniques, bien qu'efficaces, restent longues, fastidieuses et relativement coûteuses, et nécessitent d'importantes quantités de molécules à cribler afin de pouvoir évaluer les effets

concentration-dépendants éventuels. L'utilisation d'un système biomimétique miniaturisé permettrait de réduire ces quantités et les temps expérimentaux. Depuis les années 90, pour suivre des interactions moléculaires en temps réel et en absence de marquage, de nombreux capteurs basés sur le principe de résonance plasmonique de surface ont été conçus. Cette approche est parfaitement adaptée au biocapteur ADN-Protéine envisagé.

Certains auteurs ont conçu et réalisé des biocapteurs à ADN dans le but de suivre les interactions RE/ERE, en absence ou en présence de molécules à effet estrogénique potentiel. Les stratégies de greffage de l'ERE à la surface du biocapteur ont été basées sur un couplage indirect par biorecognition Avidine/Biotine (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Asano, *et al.*, 2004, Su, *et al.*, 2006, Peh, *et al.*, 2007, Teh, *et al.*, 2007, Habauzit, *et al.*, 2008). Ces constructions garantissent une bonne densité d'ADN sur le biocapteur mais présentent toutes des inconvénients en termes d'encombrement stérique, de diffusion, d'accessibilité, d'interactions non spécifiques, à l'origine d'artéfacts et limitant la pertinence de ces modèles artificiels. De plus, ces études sont difficilement comparables entre elles, car elles diffèrent en de nombreux points. Ces différences concernent l'appareil SPR utilisé (BIAcore® X, 1000, 2000, 3000 ou AutoLab ESPR (Eco Chemie)), le type de puce (CM5, SA, SAM mixte HS-PEG-SA/HS-C₁₁-OH) ainsi que la nature de l'ADN immobilisé (séquence, longueur, conformation). Il est à noter que certains auteurs n'ont pas utilisé de séquence contrôle (Asano, *et al.*, 2004, Habauzit, *et al.*, 2008), d'autres ont travaillé en absence de ligand (Su, *et al.*, 2006, Teh, *et al.*, 2007). Enfin la concentration en RE, le temps d'incubation avec le ligand, la densité d'ADN à la surface du biocapteur la composition du tampon, ainsi que le débit d'injection sont des paramètres qui diffèrent d'une étude à l'autre. Toutes ces variations expérimentales semblent avoir un impact sur les niveaux d'interaction détectés.

Pour étudier l'interaction RE/ERE, il nous est apparu nécessaire de proposer une architecture hautement contrôlée tant au niveau de l'orientation des cibles, de leur densité que de leur accessibilité.

Au sein de l'UMR FEMTO-ST, la conception et l'étude d'un biocapteur à ADN ont été menées depuis 2002 et ont permis de concevoir une nouvelle génération de biocapteurs dédiés aux interactions ADN/ADN (Boireau, *et al.*, 2002, Boireau, *et al.*, 2005b). La stratégie est basée sur l'utilisation d'une bicouche lipidique pour biofonctionnaliser le support inorganique, pour lui conférer une structure dynamique et éviter l'adsorption non spécifique des oligonucléotides sur le support. Ce type de biocapteur (brevet international Boireau W. *et al.* WO 02081740) représente une avancée technologique par rapport aux biocapteurs classiques à acides nucléiques. Ce biocapteur a été élaboré afin de proposer un environnement biomimétique assurant un contrôle dans le positionnement de l'ADN tout en limitant les contraintes exercées sur la séquence nucléotidique. Nous avons voulu appliquer ce concept à l'étude des interactions ADN/protéine. Pour ce faire, nous avons construit un biocapteur dérivé de ce modèle. Initialement, ce modèle breveté était constitué d'un bloc P-DNA ancré à la surface d'une monocouche lipidique. Ce bloc était composé d'un cytochrome b5 modifié présentant un oligonucléotide simple brin *via* un espaceur hétérobifonctionnel. Une telle structure était alors confrontée à un oligonucléotide complémentaire afin d'étudier l'hybridation de l'ADN dans un environnement dynamique. Lors de la conception de notre nouveau prototype, nous avons décidé d'assembler des blocs (P-DNA)₂, constitués de deux cytochromes b5, réunis par l'intermédiaire d'une séquence nucléotidique bicaténaire. La présence de ces deux cytochromes b5 par bloc permet de fixer les structures en deux points, ce qui confère au système une plus grande stabilité, lui permettant ainsi de résister à l'interaction de protéines de haut poids moléculaire. De plus, cette stratégie d'ancrage de la séquence nucléotidique par ces deux extrémités devrait permettre une meilleure accessibilité

des cibles ERE. Par ailleurs, la monocouche phospholipidique à la surface de la puce, qui confère au système une certaine fluidité, devrait faciliter l'agencement de l'ADN dans une configuration dépourvue de toute contrainte physique. Une telle architecture permettrait ainsi une présentation optimale de l'ERE.

Cependant, l'instabilité du récepteur aux estrogènes α (Pillon, *et al.*, 2005), nous a conduit à développer une autre stratégie d'immobilisation de l'ADN à la surface de notre biocapteur. En effet, nous avons mis en place un second prototype, baptisé « C11/C16 », reposant sur l'utilisation d'une SAM mixte composée d'acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque et de 11-mercapto-1-undécanol. Ce modèle permet lui aussi une présentation contrôlée de la séquence nucléotidique d'intérêt dans un environnement limitant les interactions non spécifiques.

D'autre part, l'étude de l'effet estrogénique des composés ne peut pas se limiter à la recherche de leur aptitude à permettre la dimérisation des RE et la fixation des dimères sur le capteur présentant l'ERE. En effet, la liaison des dimères sur l'ERE est indispensable mais non suffisante pour engendrer un effet transcriptionnel qui peut être positif ou négatif (Diel, 2002). C'est pourquoi nous avons mis en place un modèle cellulaire à partir de cellules MCF-7 qui expriment le RE α . Cette lignée a été transfectée par un vecteur contenant un gène rapporteur placé sous la dépendance de deux ERE. Ces expériences de transfection cellulaire permettront de déterminer si le RE α activé par un ligand donné exerce une régulation positive sur la transcription comme celle attendue pour RE α activé par E $_2$, ou une régulation négative.

Enfin, le choix de la chimie de surface de notre prototype de biocapteur « C11/C16 » est compatible avec l'étude des interactions protéines/protéines. Afin d'évaluer les performances de ce modèle, nous avons choisi d'étudier les interactions de la protéine GEC1, avec d'une part, un partenaire connu, la tubuline (Mansuy, *et al.*, 2004) puis d'autre part, une protéine purifiée (GST ou GST-GEC1). A plus long terme, nous souhaitons appliquer ce

biocapteur à la recherche et à l'identification de protéines dans un échantillon complexe (lysate cellulaire) *via* un couplage à la spectrométrie de masse. Le choix de GEC1 comme exemple biologique n'est pas arbitraire. En effet, après avoir identifié le gène *gec1* (Pellerin, *et al.*, 1993), l'équipe « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central » souhaite découvrir le rôle de cette protéine. L'identification des partenaires protéiques de GEC1 permettrait de mieux comprendre l'implication biologique de cette protéine.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Les composés étudiés

1.1.1 Les composés d'origine synthétique

L'ICI 182,780, un antagoniste pur de E₂ (fourni gracieusement par Astra Zeneca), a été repris dans de l'éthanol absolu.

1.1.2 Les composés d'origine naturelle

Les composés d'origine végétale ont été fournis par le Dr Girard (Equipe Optimisation Métabolique et Cellulaire, Université de Franche-Comté, IFR 133). La génistéine, la génistéine 8C glucoside, la biochanine A et la chryisine (Tableau IV) ont été reprises dans de l'éthanol absolu tout comme E₂ (Sigma-Aldrich-Aldrich). La 7-O-β-D-glucopyranosylchryisine (Tableau IV) a été dissoute dans du DiMéthyl SulfOxyde (DMSO).

Tableau IV : Structures des composés d'origine naturelle. Formules développées des différentes isoflavones étudiées (chryisine et son glucoside, génistéine et son glucoside et biochanine A), présentées en parallèle à la structure de E₂

	R₁	R₂	R₃	R₄
7-O-β-D-glucopyranosylchryisine	β-Glu	OH	H	H
chryisine	OH	OH	H	H
	R₁	R₂	R₃	R₄
génistéine	OH	OH	OH	H
Biochanine A	OH	OH	OCH3	H
8-C-b-D-glucopyranosylgénistéine	OH	OH	OH	β-Glu

1.2. Les constituants des différents biocapteurs

Le récepteur RE α humain recombinant a été obtenu auprès de la société Invitrogen. Les puces ont été réalisées par Thomas Mangeat (plateforme MIMENTO, FEMTO-ST) à partir d'une lamelle de verre ronde de 13 mm de diamètre, recouverte d'une fine couche de chrome (10 nm) permettant l'accroche d'un film d'or d'environ 40 nm.

1.2.1 Les biocapteurs ADN / protéines

1.2.1.1 Prototype « lipidique »

Le Succinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (LC-SPDP) (Pierce Biotechnologie ; Figure 25) est repris à 30 mM dans du DMSO et utilisé comme espaceur hétéro-bifonctionnel permettant le couplage d'oligonucléotides à un cytochrome b5 modifié.

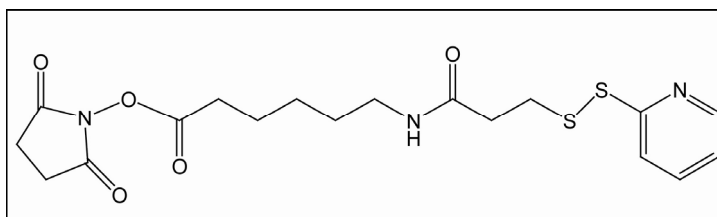


Figure 25 : Formule développée du LC-SPDP.

Les oligonucléotides A1, A3, A4 et A6 (Tableau V) s'hybridant deux à deux pour former l'ERE ou pour former une séquence contrôle ont été obtenus auprès de la société Eurogentec. La monocouche phospholipidique générée à la surface du biocapteur est composée d'un mélange de Dimyrisoyl Phosphatidyl Choline (DMPC) (Sigma-Aldrich) et de 1,2-DiOleoyl-sn-Glycero-3[(N (5-amino-1-carboxypentyl) imminodiacetic acid) Syccinyl] (DOGS) (Aventi Polar Lipids).

Tableau V : Séquences nucléotidiques utilisées dans la mise en place du prototype "lipidique". Deux oligonucléotides A1 et A3 complémentaires forment deux ERE après hybridation. Les oligonucléotides A4 et A6 complémentaires forment une séquence contrôle après hybridation, ne différant de la séquence cible qu'au niveau des quatre demi-sites de l'ERE (en respectant la proportion de nucléotides GC)

Désignation	Séquences	
A1	5'- AGTTCTTTGAT <u>TCAGGTC</u> ACTGTGACCTGAACTTGCT-3'	ERE
A3	5'-AGCAAGTT <u>TCAGGTC</u> CACAGT <u>TGACCTG</u> ATCAAAGAATAT ATAGCAAGTT <u>TCAGGTC</u> CAGT <u>TGACCTG</u> ATCAAAGA-3'	
A4	5'- AGTTCTTTGAT <u>TACGTCCC</u> ATCAAGTCACGACTTGCT-3'	Contrôle
A6	5'-AGCAAGT <u>CGTGACTT</u> GAT <u>GGGACGT</u> ATCAAAGAATAT ATAGCAAGT <u>CGTGACTT</u> GAT <u>GGGACGT</u> ATCAAAGA-3'	

1.2.1.2 Le prototype « C11 / C16 »

Ce prototype repose sur l'utilisation d'une SAM mixte composée d'un mélange de 11-mercapto-1-undécanol (HS-C₁₁-OH) et d'acide 16-mercaptohexadécanoïque (HS-C₁₅-COOH) (Sigma-Aldrich). La fixation des oligonucléotides (Eurogentec) D1 et D4 modifiés en 5' par le greffage d'une amine primaire *via* une chaîne carbonée (Tableau VI) est réalisée après activation des fonctions carboxyliques par un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS) (GE Healthcare Life Sciences). Les oligonucléotides (Eurogentec) C3 et C6 complémentaires des premiers sont hybridés par la suite afin de former l'ERE ou une séquence contrôle (Tableau VI).

Tableau VI : Séquences nucléotidiques du prototype "C11/C16". Les oligonucléotides D1 et D4 sont modifiés en 5' par le greffage d'une fonction amine primaire *via* une chaîne de 12 carbones. L'hybridation avec leurs complémentaires C3 ou C6, respectivement, permet la formation d'un ERE ou d'une séquence contrôle.

Désignation	Séquences	
D1	5'-H ₂ N-(CH ₂) ₁₂ - ATATATAGTTCTTTGATC <u>AGGTC</u> ACTG <u>TGACCT</u> GAACTTGCT-3'	ERE
C3	AGCAAGTTC <u>AGGTC</u> ACAGT <u>GACCT</u> GATCAAAGAACT	
D4	5'-H ₂ N-(CH ₂) ₁₂ - ATATATGTCCAAAGTCAATCGCCAGCACGATGATCAAAGTCC-3'	Contrôle
C6	GGACTTTGATCATCGTGCTGGCGATTGACTTTGGAC	

1.3. La lignée cellulaire MCF-7

Cette lignée a été établie à partir de cellules d'effusion pleurale obtenues chez une femme âgée de 69 ans (Soule, *et al.*, 1973). Les cellules MCF-7 sont de type épithéloïde et conservent de nombreuses caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié, comme la capacité à former des dômes et surtout l'expression du RE α (Brooks, *et al.*, 1973). Elles forment en culture une monocouche de cellules polygonales. Le caryotype de ces cellules varie de l'hypertriploïdie à l'hypotétraploïdie. Cette lignée nous a été gracieusement fournie par le Dr Saez (Centre hospitalier Lyon Sud, France).

1.4. Les vecteurs

1.4.1 Vecteur 2ERE-pS2-Luc

Le vecteur rapporteur 2-ERE-pS2-Luc contient le gène codant la luciférase de luciole sous la dépendance d'un promoteur pS2 situé en aval de deux séquences ERE. Ce vecteur

possède un gène de résistance à l'ampicilline. La souche transformée par ce vecteur rapporteur nous a été gracieusement fournie par le Dr. Katzenellenbogen (University of Illinois, Urbana, USA). Ce vecteur permet de mettre en évidence l'effet transactivateur du RE α en présence des divers composés testés.

1.4.2 Vecteur pSV β -Gal

Ce vecteur pSV- β Gal (Promega) contient le gène de la β -galactosidase placé sous la dépendance d'un promoteur précoce SV40. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline. L'activité de la β -galactosidase permet d'une part, d'évaluer l'efficacité de transfection et d'autre part, de normaliser l'activité du rapporteur luciférase.

1.4.3 Vecteurs pGEX4T2

Le vecteur pGEX4T2 (Amersham Pharmacia) contient le gène codant la GST sous le contrôle du promoteur procaryote *plac* inductible par l'IsoPropyl- β -D-Thio-Galactopyranoside (IPTG). Il permet l'expression de gènes codant des protéines de fusion entre la GST et une protéine d'intérêt. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline.

Le plasmide pGEX4T2-GEC1 contenant la séquence codant la protéine GEC1 humaine a été précédemment construit au laboratoire (Mansuy, *et al.*, 2004).

Le plasmide pGEX4T2-GABARAP contenant la séquence codant la protéine GABARAP humaine a été gracieusement fourni par le Dr Richard Olsen (University of California, Los Angeles, USA).

Ces vecteurs ont été utilisés pour la synthèse de protéines recombinantes GST, GST-GEC1 et GST-GABARAP.

1.4.4 Vecteur pSBET -FLAG-GEC1-(His)₆

Le plasmide pSBET (Schenk, *et al.*, 1995) est un vecteur d'expression procaryote contenant un gène de résistance à la kanamycine, le promoteur T7 et le gène *argU* codant l'ARNt^{Arg} (AGA/AGG) d'*Escherichia coli*. Ce dernier permet d'obtenir un haut niveau d'expression protéique chez la bactérie (Dieci, *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le plasmide pSBET dont nous disposons (gracieusement fourni par le Dr. Boyer-Guittaut) contenait aussi des séquences codant une étiquette *flag* et une *hexa-histidine*.

Au laboratoire, un insert de 351 pb, correspondant à la partie codante de l'ADNc *gacI* de cobaye, a été cloné dans ce plasmide. Cet insert ainsi bordé des deux étiquettes a été placé sous la dépendance du promoteur T7.

Le vecteur construit a été appelé pSBET-FLAG-GEC1-(His)₆. Des bactéries BL21 DE3 (Stratagène) possédant le gène codant l'ARN polymérase du phage T7 sous la dépendance d'un promoteur inductible par l'IPTG ont été transformées par ce vecteur.

Nous avons ainsi pu produire la protéine recombinante FLAG-GEC1-(His)₆.

2. Amplification, purification et séquençage des vecteurs

2.1. Transformation des bactéries compétentes

La transformation des bactéries *E. coli* compétentes (souche DH5α (Invitrogen) et BL21 DE3) est effectuée en mettant en contact sur la glace 10 à 100 ng d'ADN avec les bactéries compétentes pendant 30 min. Un choc thermique à 37°C est réalisé pendant 1 min et les bactéries sont à nouveau conservées sur la glace 2 min. Les bactéries sont remises en culture dans 1 ml de milieu Luria Bertani (LB) constitué de Tryptone 1% (p/v), d'extrait de levure 0,5% (p/v) et de NaCl 1% (p/v). Elles sont alors incubées à 37°C pendant 1 h 30 puis étalées sur milieu sélectif LB ampicilline (100 µg/ml) additionné d'agar (15 g/l).

2.2. Extraction des ADN plasmidiques

2.2.1 Mini-préparation par lyse alcaline

Cette technique permet de purifier des plasmides à partir de cultures de 2 ml. Après sédimentation, les bactéries sont lysées par une solution de SDS (1%)/NaOH (0,2 M). L'ADN chromosomique dénaturé est ensuite copécipité avec les protéines par ajout d'une solution d'acétate de sodium (5 M)/acide acétique glacial (11,5%). L'ADN plasmidique, contenu dans le surnageant, est purifié par extraction phénolique puis lavé et précipité à l'éthanol.

2.2.2 Maxi-préparation

Cette technique permet de purifier une grande quantité de plasmides à partir de culture de 200 ml. L'utilisation d'une chromatographie échangeuse d'ions (QIAfilter Plasmide Maxi Kit, Qiagen) permet d'obtenir une majorité de plasmides en conformation super enroulée afin d'augmenter l'efficacité de transfection. Les extractions ont été réalisées en respectant les recommandations du fabricant.

2.3. Séquençage des vecteurs

L'absence de mutations dans le vecteur pSBET-FLAG-GEC1-(His)₆ a été vérifiée par séquençage par Fabrice Poncet (Assistant Ingénieur dans notre équipe et responsable de la plateforme séquençage de l'IFR133) au moyen d'un séquenceur automatique (Applied Biosystem, 3130GA).

3. Culture cellulaire

3.1. Milieux de culture

Les cellules MCF-7 ont été entretenues à 37°C sous atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %), dans du Milieu Complet (MC) constitué de DMEM supplémenté de 5 % de Sérum de Veau Foetal (SVF), de 0,5 µg/ml d'insuline, de 2 mM de L-glutamine, d'antibiotiques

(pénicilline 100 U/ml ; streptomycine 100 µg/ml), et d'un antifongique (Fongizone 0,23 U/ml).

3.2. Passage des cellules

Les cellules MCF-7 sont sous-cultivées 2 fois par semaine etensemencées à raison de 13 000 cellules/cm² dans des boîtes de culture de 75 cm² dans du MC frais. Le milieu est éliminé et remplacé par du MC frais tous les deux jours, entre deux sous-cultures. Les cellules MCF-7 sont décollées à l'aide de la trypsine. Le surnageant de culture est éliminé et remplacé par 3 ml de Hank's-EDTA 0,03% qui est ensuite éliminé après 3 minutes d'incubation. Elles sont incubées dans 1 ml de trypsine pendant 10 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée par 4 ml de MC. Les cellules sont prélevées et centrifugées pendant 5 minutes à 600 g. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de MC et la quantité de cellules nécessaire estensemencée dans une nouvelle boîte et du MC est ajouté en quantité suffisante pour 10 ml.

3.3. Congélation et décongélation des cellules

Pour la congélation, des cellules en phase exponentielle de croissance (de 5x10⁶ à 5x10⁷ cellules) sont trypsinées puis reprises dans 10 ml de MC. Après centrifugation (5 min, 500 g), le culot est remis en suspension dans 1 ml de SVF additionné de 5% de DMSO. La suspension cellulaire est placée dans un cryotube puis congelée par paliers successifs (10 min à 0°C, 20 min à -20°C et une nuit à -80°C), puis plongée dans l'azote liquide à -196°C où les cellules peuvent être conservées sans limitation de durée.

Pour la décongélation, le cryotube de cellules est placé dans la glace, puis plongé dans un récipient contenant de l'eau stérile à 37°C. La décongélation doit être très rapide : 40-60 secondes. Le tube est ensuite immergé dans un autre récipient contenant de l'alcool à 70% à température ambiante, et le contenu est transféré dans un tube stérile contenant 10 ml de milieu complet. Après centrifugation (10 min, 500 g), le surnageant est éliminé et le culot

cellulaire est remis en suspension dans 10 ml de MC puis placé dans une boîte de culture de 75 cm².

3.4. Transfection cellulaire transitoire

Les cellules ont été cultivées 48 heures avant transfection dans du MC contenant 5 % de SVF déstéroïdé (MCDS). Elles ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits, puis incubées 24 heures. La transfection a été réalisée après lavage des cellules avec du milieu de base (DMEM). Un mélange constitué de 1 µg de plasmide 2ERE-pS2-Luc et de 0,75 µg de pSV-βGal a été incubé pendant 10 minutes avec 1 µg de liposomes (Transfast, Promega). Le milieu de base a été éliminé, puis le mélange a été ajouté dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C sous atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %). Après 2 heures d'incubation, 800 µL de Milieu de Stimulation (MS), composé de MC contenant 0,5 % de SVF déstéroïdé, ont été ajoutés à chaque puits. Une stimulation par les différents composés à tester, a été réalisée pendant 48 heures à 37°C sous atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %).

4. Analyse, expression et purification de protéines

4.1. Détermination des activités enzymatiques luciférase et β-galactosidase

A la fin de la stimulation, les cellules transfectées par le vecteur rapporteur 2 ERE-pS2-Luc sont lavées au PBS (Phosphate Buffer Saline) puis lysées par ajout de 150 µl de tampon de lyse (Promega) et par congélation/décongélation. Les lysats ont été centrifugés et les surnageants ont été stockés à -20°C. Afin de normaliser les résultats, il est nécessaire de déterminer l'activité de la β-galactosidase indépendante de l'effet estrogénique. Dans une plaque 96 puits, 30 µl de chaque extrait ont été déposés et complétés par 70 µl d'une solution contenant 47 mM de tampon phosphate pH 7,5 ; 2,92 µM d'Ortho-Nitro-Phényl-β-D-

galactopyranoside (ONPG) (Sigma-Aldrich), 1 mM de $MgCl_2$ et 45 mM de β -mercaptoéthanol. La plaque a été incubée 30 à 40 minutes à 37°C, puis la réaction a été stoppée par ajout de 150 μ l de Na_2CO_3 (1 M). La β -galactosidase dégrade l'ONPG et libère de l'orthonitrophénol qui a été dosé par spectrophotométrie à 405 nm.

L'activité luciférase a été déterminée par ajout de 75 μ l de Luciferase Assay Reagent (Promega) à 20 μ l d'extraits protéiques dans une plaque 96 puits. Cette enzyme, en présence d'ATP, oxyde la luciférine. Cette réaction provoque une production de photons quantifiée à l'aide d'un luminomètre Victor2 (PerkinElmer Life And Analytical Sciences).

4.2. Analyse biochimique des protéines d'intérêt

4.2.1 Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Les protéines de l'échantillon sont dénaturées par addition d'un tampon de charge [Tris-HCl (pH 6,8 ; 312 mM) SDS (10% p/v), glycérol (50% v/v), β -mercaptoéthanol (25% v/v), bleu de bromophénol (0,1% p/v)] et par chauffage à 100°C pendant 3 minutes. L'extrait protéique est ensuite déposé sur un gel composé d'un gel de séparation à 12% d'acrylamide pH 8,8 et d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide pH 6,8. La migration est réalisée dans un tampon Tris-HCl (pH 8,3 ; 25 mM), glycine (192 mM) et SDS (0,1% p/v) à une intensité constante de 20 mA jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

4.2.2 Western blotting

Les protéines, après électrophorèse dénaturante en présence de SDS, sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, Hybond P, Amersham Pharmacia) sous l'effet d'un champ électrique (Towbin, *et al.*, 1979) dans un tampon de transfert composé de Tris (pH 8,3 ; 25 mM), glycine (192 mM), et méthanol (10% v/v). Le transfert est effectué pendant 1 h 30 min sous une intensité constante de 250 mA.

A la fin du transfert, la membrane est incubée dans une solution de TBS-Tween 20 0,1% (Tris-HCl Buffer Saline) contenant 5% de lait écrémé pendant 1 h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite incubée pendant 1 h sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-0,1% Tween 20 supplémenté de 0,5% de lait écrémé. Après lavage avec du TBS-0,1% Tween 20 (3 x 5 min), la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (Horseradish Peroxydase) dilué au 1/20000^{ème} dans du TBS-0,1% Tween 20 supplémenté de 0,5% de lait écrémé. La membrane est lavée (3 x 5 min) dans du TBS-0,1% Tween 20, puis rincée dans du TBS. L'activité peroxydase est révélée à l'aide du kit ECL Plus (GE HealthCare Life Sciences) et d'un film autoradiographique.

4.3. Production et purification de protéines recombinantes

4.3.1 Protéines GST, GST-GEC1 et GST-GABARAP

Les bactéries *E. coli* DH5 α , transformées par les plasmides d'expression codant la protéine GST ou les protéines de fusion GST-GEC1 ou GST-GABARAP, sont cultivées dans du milieu LB plus ampicilline sous agitation à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,6 à 600 nm. L'expression des protéines recombinantes est induite durant 1 h par 0,4 mM d'IPTG. Les bactéries sont ensuite centrifugées (5000 g, 15 min, 4°C) et le culot est repris dans un tampon de lyse PBST (PBS, Triton X-100 1%, β -mercaptoéthanol 14,2 mM, inhibiteur de protéases : aprotinine 4 μ g/ml, leupeptine 2 μ g/ml, pepstatine A 1 μ g/ml et phénylméthylsulfonyl fluoride 0,2 mM). Une sonication 3 fois 15 sec sur la glace permet d'augmenter l'efficacité de la lyse.

Après centrifugation (10 min, 10000 g, 4°C), le surnageant est incubé avec une suspension de billes de glutathion sépharose (Amersham Pharmacia) 30 min à 4°C sous agitation rotative. La GST se fixe à son substrat, le glutathion, mais est incapable de le métaboliser. Le complexe ainsi formé (billes-glutathion-GST-protéine d'intérêt) peut être séparé des protéines solubles par centrifugation (15 min, 10000 g, 4°C). Après plusieurs

lavages avec le tampon PBST, les protéines de fusion sont éluées avec une solution contenant du glutathion réduit (10 mM) et du Tris-HCl (pH 8,0 ; 50 mM). Les protéines purifiées sont dialysées dans le tampon suivant : Tris-HCl (pH 7,6 ; 20 mM), NaCl (100 mM), EDTA (1 mM) et glycérol (20%, v/v). Les protéines purifiées sont ensuite dosées par la méthode Bradford, puis leur intégrité est évaluée par électrophorèse SDS-PAGE colorée au bleu de Coomassie.

4.3.2 Protéine FLAG-GEC1-(His)₆

Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3), transformées par le plasmide d'expression pSBET codant la protéine FLAG-GEC1-(His)₆, sont cultivées dans du milieu LB supplémenté de kanamycine sous agitation à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,6 à 600 nm. La synthèse de la protéine recombinante est induite par une stimulation de 2 heures à l'IPTG 0,5 mM. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation, puis lysées dans du tampon PBST (comme précédemment décrit). La protéine FLAG-GEC1-(His)₆ est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité au nickel (grâce à son étiquette histidine). Pour cela, une colonne de billes d'agarose couplées à l'acide iminodiacétique (IDA) est équilibrée en tampon acétate 100 mM pH 7,8, puis chargée en Ni²⁺ à l'aide d'une solution de NiCl₂ à 50 mM. Après élimination de l'excès de NiCl₂, la colonne est équilibrée en tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Le surnageant est alors déposé sur la colonne, qui est ensuite lavée abondamment au tampon phosphate. La protéine FLAG-GEC1-(His)₆ est éluée à l'aide d'une solution d'histidine à 1 g/l, puis dosée par la méthode Bradford. Le degré de pureté est évalué par électrophorèse SDS-PAGE colorée au bleu de Coomassie.

4.4. GST pull-down

Les protéines purifiées GST, GST-GEC1 et GST-GABARAP (20µg) sont incubées 1h30 avec des billes de sépharose couplées à du glutathion préalablement lavées avec du tampon (Tris-HCl 100 mM pH 7,6 ; NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, Triton

X100 1% et inhibiteurs de protéases). Les billes sont ensuite lavées deux fois avec du tampon HBS-EP (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 0,005% ; GE Healthcare Life Sciences) supplémenté de 40 mM d'Octyl Glucopyranoside (OG ; Sigma-Aldrich). La protéine recombinante FLAG-GEC1-(His)₆ (10µg) est ensuite incubée avec les billes couplées aux différentes protéines de fusion à 4°C sur la nuit. Cette étape est suivie d'un lavage à l'aide d'HBS-EP, puis de deux lavages au PBS. Les différentes protéines sont ensuite dissociées et dénaturées par ajout de tampon de charge (électrophorèse SDS-PAGE) et chauffage à 95°C pendant 3 minutes. Les différents échantillons sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE, puis la protéine FLAG-GEC1-(His)₆ est détectée par western blotting à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'étiquette histidine (dilution 1/3000^{ème}).

5. Assemblage des biocapteurs

L'assemblage des biocapteurs ainsi que les mesures des différentes interactions ont été réalisés par SPR à l'aide d'un BIAcore[®] 2000 (GE Healthcare Life Sciences) et suivis en temps réel à l'aide du logiciel : BIACORE 2000 Control Software.

5.1. Les Biocapteurs ADN/protéine

5.1.1 Prototype « lipidique »

5.1.1.1 Spécificité

L'originalité de cette approche réside dans le fait que les ADN cibles (ERE ou séquence contrôle) sont non pas greffés directement sur une puce d'or, mais greffés *via* une protéine d'ancrage redox (cytochrome b5) sur une monocouche lipidique recouvrant la puce d'or. Nous avons utilisé deux séquences d'ADN bicaténaire. L'une résulte de l'hybridation de deux oligonucléotides A1 avec l'oligonucléotide A3 et contient donc deux ERE. L'autre, servant de contrôle, résulte de l'hybridation de deux oligonucléotides A4 avec un oligonucléotide A6 et ne contient pas d'ERE (Figure 26).

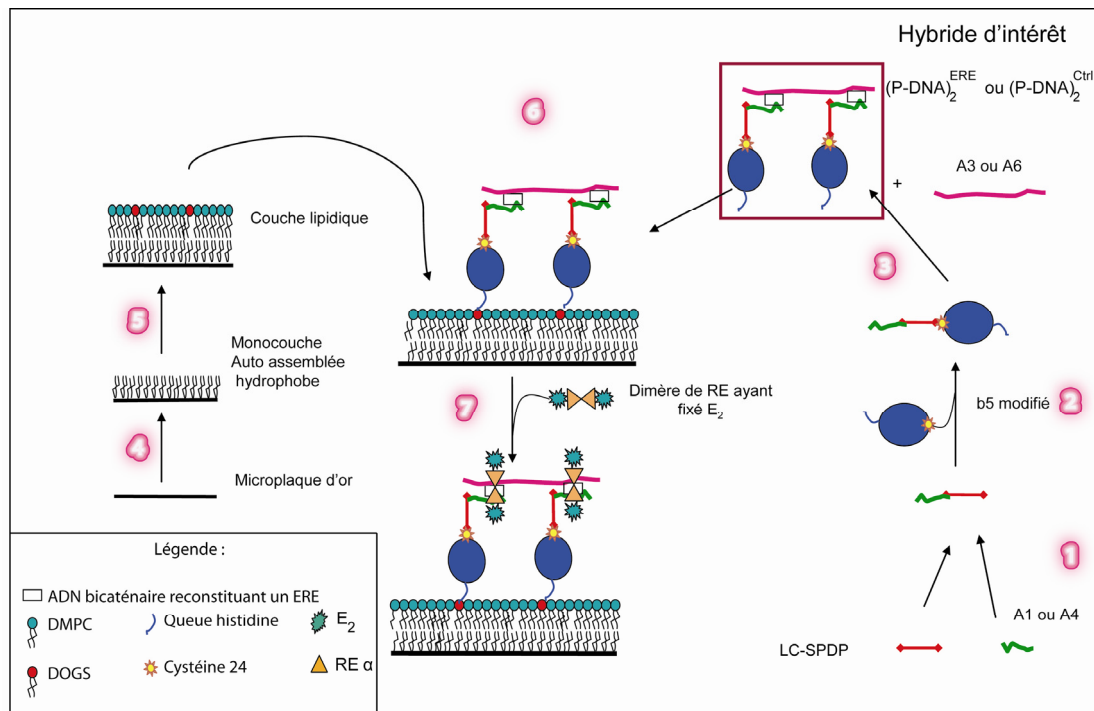


Figure 26 : Représentation schématique du prototype "lipidique". La mise en place de ce biocapteur nécessite d'une part, la formation des $(P-DNA)_2^{ERE}$ et $(P-DNA)_2^{Ctrl}$ (étapes 1 à 3), puis d'autre part, la mise en place d'une monocouche lipidique (étapes 4 et 5). Les blocs $(P-DNA)_2$ sont ensuite greffés à la couche lipidique *via* une interaction histidine/ Ni^{2+} (étape 6). Le biocapteur peut alors être confronté au RE préalablement incubé avec E_2 (étape 7).

5.1.1.2 Couplage des oligonucléotides au cytochrome b5 modifié

Les oligonucléotides A1 ou A4 lyophilisés ont été repris dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,5. L'étape de couplage des oligonucléotides avec le LC-SPDP a été réalisée pendant 17 heures à température ambiante sous agitation, avec un rapport molaire entre ADN et LC-SPDP de 1/25. L'excès de LC-SPDP a été éliminé par lavage au tampon phosphate 50 mM pH 7,5 lors d'une étape de chromatographie échangeuse d'ions (DEAE). Les oligonucléotides, en interaction avec la colonne, ont été élués par du tampon phosphate 50 mM NaCl 1 M. Le rendement de couplage entre l'oligonucléotide et le LC-SPDP a été déterminé par ajout d'un excès de DTT (20 mM). Cet agent réducteur clive le LC-SPDP et libère de la thiopyridine dosable par spectrophotométrie à 343 nm. La quantité d'ADN éluee a

été dosée par spectrophotométrie à 260 nm et le rapport entre la quantité de thiopyridine libérée et la quantité d'oligonucléotides correspond au rendement de couplage.

Chaque complexe (ADN/LC-SPDP) doit être couplé à un cytochrome b5 modifié. Ce cytochrome présente d'une part, une étiquette polyhistidine permettant l'accrochage à la monocouche lipidique *via* une interaction histidine/ Ni^{2+} et d'autre part, en position 24, une cystéine unique (au lieu d'une sérine) permettant le couplage par liaison covalente au LC-SPDP. Cette cystéine a été réduite en incubant 10 minutes à température ambiante le cytochrome b5 avec du DTT dans un rapport molaire entre la protéine et l'agent réducteur de 1/10. Le DTT a ensuite été séparé de la fraction protéique par chromatographie d'exclusion (Sephadex G25). Les complexes ADN/LC-SPDP ont été incubés une nuit à température ambiante sous agitation avec une quantité équivalente de cytochrome b5 réduit. Les complexes ADN/LC-SPDP/b5 (appelé P-DNA) ont été purifiés en deux étapes. Dans une première étape, les complexes ADN/LC-SPDP n'ayant pas réagi avec le cytochrome b5 ont été éliminés par chromatographie d'affinité à l'histidine à l'aide d'une colonne IDA (cf paragraphe 4.3.2 ci-dessus). Les oligonucléotides non couplés au b5 n'ont aucune affinité pour le nickel et ont été éliminés par lavage au tampon phosphate 50 mM pH 7,5. Les b5 couplés ou non ont été élués par une solution d'histidine à 1 mg/ml dans du tampon phosphate. Dans une deuxième étape, pour éliminer le cytochrome b5 libre, une chromatographie échangeuse d'ions a été réalisée. Après lavage au tampon phosphate 50 mM pH 7,5, les b5 non couplés ont été élués par du tampon phosphate NaCl 0,25 M. Les b5 couplés aux oligonucléotides *via* le LC-SPDP ont été élués par du tampon phosphate NaCl 1 M, puis l'ADN et le b5 ont été dosés par spectrophotométrie respectivement à 260 nm et 412 nm.

5.1.1.3 Formation des hybrides d'intérêt : (P-DNA)₂

Dans un premier temps, les oligonucléotides A3 ou A6 ont été repris dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7,5. Une mole de A3 a été incubée une nuit à 4°C avec 3 moles de complexe A1/LC-SPDP/b5 (appelé P-DNA^{ERE}) ou 1 mole de A6 avec 2 moles de A4/LC-SPDP/b5 (appelé P-DNA^{Ctrl}). Suite à cette étape d'hybridation, le mélange réactionnel contient 3 populations : l'excès de complexe P-DNA^{ERE} ou P-DNA^{Ctrl}, les hybrides partiels (P-(DNA)₂) ne contenant qu'un ERE ou qu'une séquence contrôle et les hybrides d'intérêt (Figure 26) qui sont A3-(A1/LC-SPDP/b5)₂ ou A6-(A4/LC-SPDP/b5)₂ appelés respectivement (P-DNA)₂^{ERE} et (P-DNA)₂^{Ctrl}. Ces différentes populations ont été séparées par chromatographie d'exclusion (Superdex G75 et tampon PBS 0,1M pH 7.5) puis dosées par spectrophotométrie à 260 nm et 412 nm. Le rapport des absorbances aux deux longueurs d'onde permet de caractériser la population collectée contenant plus ou moins d'ADN et de cytochrome b5.

Afin d'évaluer la pureté des (P-DNA)₂^{ERE} et (P-DNA)₂^{Ctrl}, une séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide 12,5 % a été réalisée. Pour ne pas altérer la structure des dimères, le tampon de charge a été préparé sans β-mercaptoéthanol (SDS 2 %, bleu de bromophénol 0,001 %, Tris-HCl 62,5 mM, Glycérol 10 %) et les échantillons n'ont pas été chauffés de façon à ne pas dénaturer les complexes. La détection des protéines a été réalisée par une coloration au bleu de Coomassie sur la nuit et une décoloration (acide acétique 10 %, méthanol 30 %) de deux heures. L'ADN bicaténaire a été révélé par immersion du gel une nuit dans un bain de bromure d'éthidium (BET), suivie d'une exposition à la lumière UV (312 nm).

5.1.1.4 Assemblage du biocapteur

Ce prototype reposant sur l'utilisation d'une surface phospholipidique, il est nécessaire de générer des liposomes composés de 90 % de DMPC et 10 % de DOGS. Chaque DOGS

possède un groupement IDA présentant un ion Ni^{2+} à la surface du biocapteur ce qui permet l'immobilisation des blocs $(\text{P-DNA})_2$ *via* une interaction histidine/ Ni^{2+} . Ces deux lipides ont été repris dans du chloroforme et après évaporation de ce solvant, le film lipidique a été repris dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,5 puis soniqué 20 minutes à température ambiante et extrudé à l'aide d'une membrane de polycarbonate percée de pores de 50 nm, afin d'obtenir des vésicules de taille identique. L'architecture supramoléculaire (Figure 26) repose sur une microplaque d'or rendue préalablement hydrophobe par traitement de 12 heures à l'Octadécyl Mercaptan 1mM (OM, Sigma-Aldrich).

La biopuce est ensuite placée dans le BIAcore[®]. La surface est alors mouillée par 20 μl d'éthanol à 50 %, puis nettoyée à l'aide de 20 μl de détergent non ionique, l'OG 40 mM (Sigma-Aldrich). La fusion des vésicules lipidiques avec la surface de la puce d'or a été effectuée en injectant ces vésicules 30 minutes à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ à 25°C. L'excès de lipides en interaction avec la monocouche lipidique plane a été éliminé par deux injections de NaOH à 20 mM (1 minute à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Les blocs $(\text{P-DNA})_2$ étant solubilisés dans du PBS, il a été nécessaire de remplacer le tampon phosphate au contact de la puce d'or par du PBS pour s'affranchir de la variation d'indice de réfraction pouvant perturber l'analyse du signal d'accrochage. Préalablement à l'injection des blocs d'intérêt, les DOGS ont été rechargés en nickel à l'aide d'une solution de NiCl_2 20 mM pendant 1 minute à 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Les $(\text{P-DNA})_2$ ont été fixés, *via* l'étiquette polyhistidine des cytochromes b5, sur les cations nickel présents à la surface des DOGS (40 minutes à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$).

5.1.1.5 Etude de l'interaction du RE avec l'ADN

Simultanément à la réalisation de cet assemblage, une incubation des récepteurs $\text{RE}\alpha$ à 50 pmol/ml avec E_2 1 nM a été réalisée pendant 4 heures à 4°C. Les complexes $\text{RE}\alpha/\text{E}_2$ ou les récepteurs $\text{RE}\alpha$ seuls ont ensuite été injectés pendant 5 minutes à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Les (P-DNA)₂ étant liés à la surface *via* une interaction histidine/Ni²⁺, ceux-ci peuvent être décrochés de la surface à l'aide d'un compétiteur comme l'imidazole. Le biocapteur peut ainsi être régénéré avec 3 pulses (30 s à 20 µl/min) d'imidazole 0,5 M.

5.1.1.6 Microscopie à force atomique (AFM)

Afin de contrôler les différentes étapes d'assemblage du prototype « lipidique », une étude a été réalisée, en parallèle par microscopie à force atomique (AFM). Les expériences ont été menées par le Dr Céline Elie-Caille (Institut FEMTO-ST, plateforme protéomique CLIPP) à l'aide d'un microscope AFM MultiMode (Digital Instruments, Veeco).

5.1.2 Prototype « C11/C16 »

5.1.2.1 Spécificité

Ce prototype (Figure 27) repose sur l'utilisation d'une SAM constituée de 90% de HS-C₁₁-OH et de 10% de HS-C₁₅-COOH.

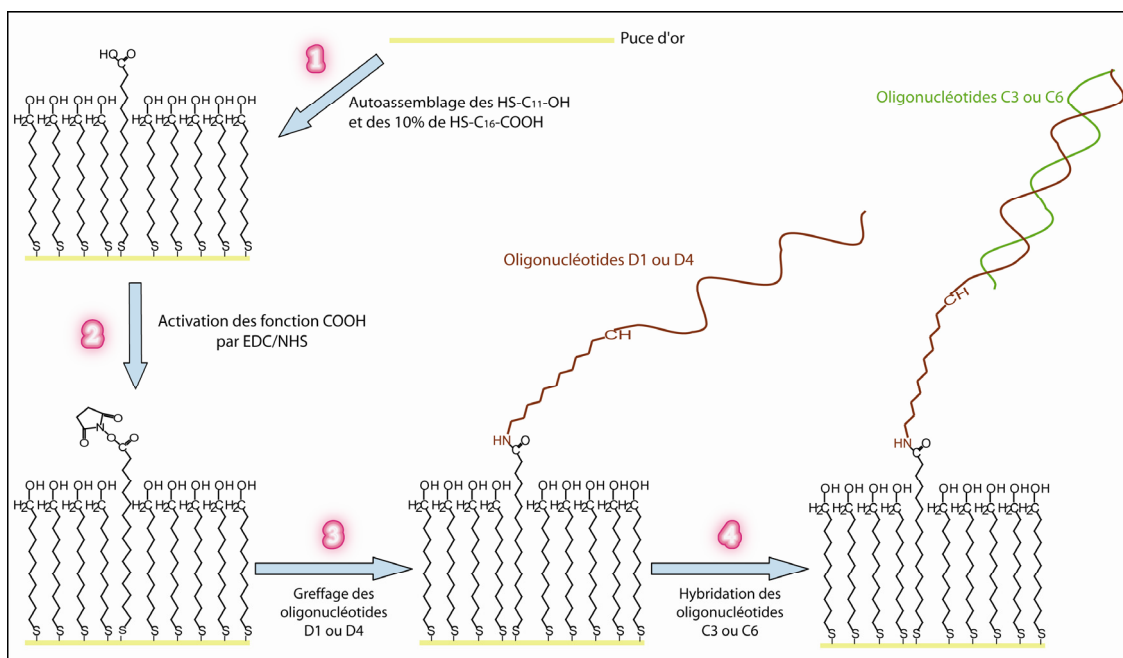


Figure 27 : Représentation schématique du prototype "C11 / C16" (ADN / protéine). La mise en place de ce biocapteur débute par l'autoassemblage d'une SAM mixte (étape 1) suivie par l'activation des fonctions carboxyliques (étape 2) qui permettront ainsi le greffage d'ADN possédant en 5' une fonction amine primaire (étape 3). Les séquences bicaténaire (ERE ou contrôle) sont reconstituées par hybridation d'oligonucléotides complémentaires (étape 4).

Les HS-C₁₁-OH vont former une monocouche dense capable de réduire l'accessibilité de la surface d'or, limitant ainsi les phénomènes d'adsorption de protéines sur le support métallique. Les HS-C₁₅-COOH, après activation par un mélange EDC/NHS, vont permettre le greffage, par liaison covalente, d'oligonucléotides possédant une fonction amine primaire (Huang, *et al.*, 2005).

5.1.2.2 Assemblage du biocapteur

Après lavage à l'éthanol puis à l'eau ultrapure, la puce est incubée 12 heures avec 0,9 mM de HS-C₁₁-OH et 0,1 mM de HS-C₁₅-COOH. Ces molécules s'autoassemblent à la surface de la puce d'or. La SAM mixte formée est lavée à l'éthanol puis à l'eau ultrapure.

Les étapes d'activation de la surface et de greffages des oligonucléotides D1 et D4, sont réalisées avec un tampon de course HBS-N (Hepes 10 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM), la surface est lavée par un pulse d'OG (15 µl à 30 µl/min). Les fonctions carboxyliques des HS-C₁₅-COOH sont activées par deux injections successives d'un mélange (v/v) d'EDC/NHS (70 µl à 10 µl/min). Afin d'éviter les répulsions de charge entre la surface et les oligonucléotides, ceux-ci seront dilués à 10 µM dans un tampon Hepes 10 mM pH 8,4 contenant 0,4 mM de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB). Ce détergent ionique forme des micelles chargées positivement capables d'interagir avec l'ADN (Chatterjee, *et al.*, 2002). Le mélange ADN-CTAB est injecté à 10 µl/min pendant 15 minutes. Une fois les oligonucléotides simples brins D1 et D4 fixés à la surface du biocapteur, l'excès de fonctions NHS-esters est alors inactivé par une injection de 140 µl d'éthanolamine 1 M à 10 µl/min.

L'étape d'hybridation des oligonucléotides complémentaires nécessite le changement du tampon de course par le tampon HBS-EP (GE healthcare Life Sciences). Les oligonucléotides simple brin C3 et C6 (2,5 µM dans du HBS-EP) sont injectés 2 minutes à 10 µl/min. La surface est alors lavée par un pulse de 40 mM d'OG (15 µl à 30 µl/min).

5.1.2.3 Criblage de composés

Le tampon de course est remplacé par du tampon Hepes 40 mM pH 7,4 ; NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM et Triton X-100 0,2%, afin de suivre l'interaction du RE avec sa cible ADN. Le récepteur (10 nM) est incubé 30 minutes à température ambiante avec les composés à tester, en veillant à ne pas dépasser 0,1% de solvant organique dans la phase aqueuse (0,2% maximum en cas de mélange). Le mélange est ensuite injecté 3 minutes à 30 µl/min, puis, après quelques minutes de dissociation, la surface est régénérée par une injection de SDS 0,5 %, EDTA 100 mM (50 µl à 5 µl/min).

5.2. Biocapteur protéines/protéines

5.2.1 Spécificité

Ce biocapteur est basé sur l'utilisation d'une SAM mixte composée de 3% de HS-C₁₅-COOH. Ces molécules permettront, après activation, la fixation d'un anticorps monoclonal de souris anti-FLAG (Figure 28).

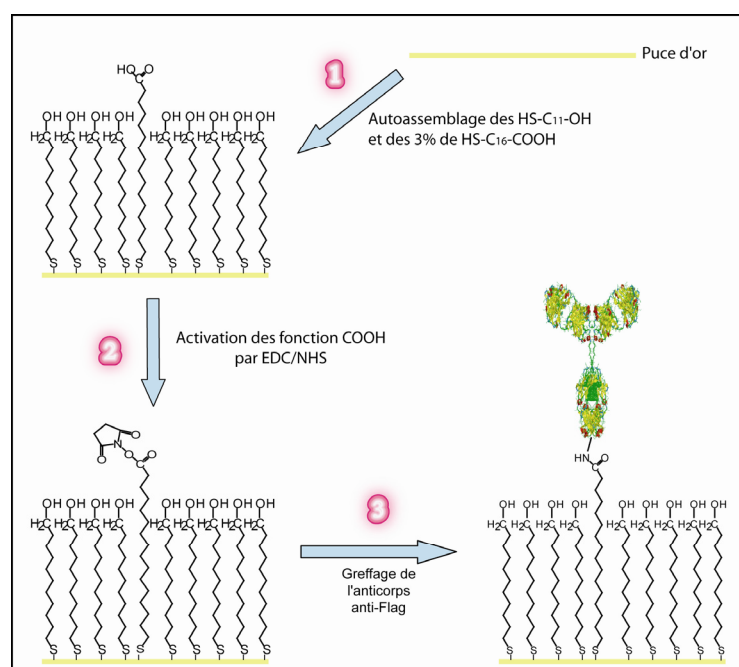


Figure 28 : Représentation schématique du capteur protéines/protéines. La mise en place de ce biocapteur débute par l'autoassemblage d'une SAM mixte (étape 1) suivi par l'activation des fonctions carboxyliques (étape 2) qui permettront ainsi le greffage d'un anticorps anti-FLAG *via* une amine primaire (étape 3).

5.2.2 Assemblage du biocapteur

Un test de préconcentration a permis de déterminer le tampon optimal pour l'immobilisation de l'anticorps (30 µg/ml), à savoir un tampon acétate 10 mM pH 6. En effet, sous cette condition de pH, compris entre le pKA de la monocouche et le pHi de l'anticorps, les répulsions de charges sont minimisées. Comme précédemment décrit (cf paragraphe 5.1.2.2 ci-dessus), les fonctions carboxyliques sont activées par un mélange EDC/NHS. L'anticorps est alors injecté (150 µl à 5 µl/min) dans les conditions optimales, déterminées au préalable. L'excès de fonctions NHS-ester est inactivé par une injection d'éthanolamine.

La protéine FLAG-GEC1-(his)₆ est ensuite capturée à la surface du biocapteur par reconnaissance biomoléculaire de l'étiquette FLAG par l'anticorps. Il est à noter que la stratégie de fixation de cette protéine *via* son étiquette FLAG (après une purification grâce à sa queue histidine) permet d'augmenter le degré de purification de celle-ci.

5.2.3 Confrontation de partenaires potentiels

Nous avons ensuite confronté le biocapteur aux protéines purifiées GST et GST-GEC1 (1 µM ; 100 µl à 20 µl/min). Toutes les interactions ont été étudiées à 25°C dans du tampon HBS-EP (GE Healthcare Life Sciences) supplémenté de 40 mM d'OG.

RESULTATS

1. Mise au point des biocapteurs ADN/protéine

1.1. Le prototype « lipidique »

1.1.1 Conception et caractérisation du biocapteur

L'activité estrogénique d'un composé est souvent analysée par des études de prolifération de cellules de cancer du sein, des études de la croissance utérine chez le rongeur ou encore par la technique de transfection cellulaire à l'aide de vecteurs rapporteurs. Ces techniques qui permettent de définir le caractère agoniste ou antagoniste d'un composé, restent longues, fastidieuses et relativement coûteuses, et nécessitent d'importantes quantités de molécules à cribler afin de pouvoir évaluer les effets concentration-dépendants éventuels. Or, la modulation transcriptionnelle d'un gène cible nécessite, dans un premier temps, la liaison des RE à leur séquence ADN cis-régulatrice. Ainsi, l'utilisation d'un biocapteur permettant un premier tri de la chimiothèque étudiée afin de ne retenir que les molécules susceptibles d'influencer l'interaction ADN/protéine, confère à la fois un gain de temps et d'argent.

Nous avons mis au point un biocapteur SPR destiné à l'étude des interactions RE/ERE. Les stratégies de greffage de l'ERE sur le biocapteur, généralement basées sur une biorecognition avidine/biotine, garantissent une bonne densité d'ADN sur le biocapteur mais présentent de fortes limites en termes d'encombrement stérique, de diffusion, d'accessibilité, d'interactions non spécifiques. L'ensemble de ces inconvénients peut être à l'origine d'artéfacts limitant ainsi la pertinence de ces modèles artificiels. Pour étudier cette interaction, il apparaît donc nécessaire de reproduire un environnement biomimétique hautement contrôlé permettant un ajustement précis de la densité d'ADN, ainsi qu'une bonne exposition des sites ERE à la surface du capteur.

Pour tenir compte de tous ces paramètres, nous avons développé une approche reposant sur un greffage des ADN cibles *via* une protéine d'ancrage redox (cytochrome b5) sur une monocouche lipidique recouvrant la puce d'or. Cette monocouche est composée d'un mélange de DMPC et de DOGS. Ces derniers possèdent des groupements IDA qui permettent l'ancrage des complexes supramoléculaires ADN-cytochrome b5 appelés (P-DNA)₂. Ceux-ci sont constitués entre autre de deux cytochromes b5. Une telle architecture confère donc deux points d'ancrages à la séquence nucléotidique. Par ailleurs, nous avons corrélé la densité de (P-DNA)₂ à la proportion de DOGS dans la monocouche. Ainsi, la modulation de la quantité de lipides d'ancrage permet d'ajuster la densité de cible à la surface du biocapteur.

L'étude en parallèle des différentes étapes d'assemblage de ce biocapteur par Microscopie à Force Atomique (AFM) a permis de confirmer que notre stratégie d'immobilisation d'ADN était spécifique et réversible. De plus, le balayage de la surface par la pointe AFM a engendré un mouvement des (P-DNA)₂, ce qui confirme qu'une telle architecture confère aux cytochromes b5 une bonne mobilité bidimensionnelle. Cette propriété dynamique devrait permettre l'agencement de l'ADN dans une configuration réduisant les contraintes physiques. La hauteur des (P-DNA)₂ est d'environ 5 nm et la présence de deux points d'ancrage permet d'éloigner la séquence nucléotidique de la surface favorisant une exposition optimale des cibles ADN.

Enfin, une fois l'architecture de ce prototype totalement maîtrisée, nous avons pu mettre en évidence une interaction spécifique du RE avec sa cible ERE. Ceci valide l'utilisation de ce biocapteur dans l'étude des interactions ADN/protéine. Il est à noter qu'un tel biocapteur n'est pas restreint au criblage de composés estrogéniques. En effet, ce prototype pourrait être utilisé pour l'étude du rôle de la séquence nucléotidique dans la biorecognition RE/ADN, ou plus globalement, pour la compréhension des mécanismes d'interactions des facteurs de transcription avec une cible nucléotidique.

Ces résultats sont présentés dans la publication numéro I.

Nanobioengineering and Characterization of a Novel Estrogen Receptor Biosensor

Alexandre Berthier, Céline Elie-Caille, Eric Lesniewska, Régis Delage-Mourroux et Wilfrid

Boireau

Sensors

2008 ; vol 8 : 4413-4428

Article

Nanobioengineering and Characterization of a Novel Estrogen Receptor Biosensor

Alexandre Berthier^{1,2}, Céline Elie-Caille¹, Eric Lesniewska³, Régis Delage-Mourroux² and Wilfrid Boireau^{1,*}

- 1 Institut FEMTO-ST, Université de Franche Comté, Clinical-Innovation Proteomic Platform, CNRS – 25044 Besançon cedex, France; E-Mails: alexandre.berthier@cliproteomic.fr (Alexandre Berthier) ; celine.caille@cliproteomic.fr (Céline Elie-Caille)
- 2 Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, EA3922, IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France; E-mail: regis.delagemourroux@cliproteomic.fr (Régis Delage-Mourroux)
- 3 Institut Carnot Bourgogne UMR CNRS 5209, Nanosciences Department, University of Bourgogne, B.P. 47870, 21078 Dijon Cedex, France; E-mail: eric.lesniewska@cliproteomic.fr (Eric Lesniewska)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: wilfrid.boireau@cliproteomic.fr; (Wilfrid Boireau) Tel.: +33-381-853-959; Fax: +33-381-853-998

Received: 12 June 2008; in revised form: 15 July 2008 / Accepted: 25 July 2008 /

Published: 28 July 2008

Abstract: We constructed an original supramolecular assembly on a surface of sensor composed of an innovative combination of an engineered cytochrome b5 and a modified nucleic acid bound to a synthetic lipid hemimembrane. The protein/DNA block, called (P-DNA)₂, was synthesized and purified before its immobilization onto a hybrid bilayer reconstituted on a gold surface. Surface plasmon resonance (SPR) and atomic force microscopy (AFM) were engaged in parallel on the same substrates in order to better understand dynamic events that occur at the surface of the biosensor. Good correlations were obtained in terms of specificity and reversibility. These findings allow us to present a first application of such biosensor in the study of the interaction processes between nuclear receptor and DNA.

Keywords: Nano-objects, molecular lego, AFM; SPR; Protein/DNA interaction.

1. Introduction

Reconstitution of lipid membranes onto inorganic or metallic substrates in a biochip approach has been extensively studied during the last decade [1;2]. Especially in biosensor development, investigations on bio-molecular recognitions, interactions or captures in a biomimetic environment can be an advantage in comparison with others functionalization processes. This has been recently pointed out in many biochip approaches involving peptide or protein chips [3-5]. Moreover, a critical step in the making of these biochips was the development of appropriate surface immobilization protocols. In order to prevent steric hindrances and random organizations, the immobilization of ligands must be highly controlled. This major drawback was often occulted leading to not completely optimized sensors. Beyond the biomimetic point of view, lipid membranes have shown strong versatility in their composition leading to many lipid-based functionalization strategies [6;7]. The most common approach is based on the introduction of small fractions of modified lipids allowing chemical or biochemical immobilizations on surface. A very promising strategy, inspired by ion metallic affinity chromatography (IMAC), was developed by the Tampé and Arnold groups in 1997/1998 [8;9] and significantly developed since 2002 [10-12]. It consists of incorporating synthetic lipids bearing a nitrilotriacetic acid (NTA) or iminodiacetic acid (IDA) moieties that complex metallic divalent ions such as Cu^{2+} , Zn^{2+} or Ni^{2+} . Such surfaces efficiently capture histidine-tagged proteins by coordination bonds but, contrary to covalent coupling, these bonds were characterized by reversibility properties. Thus, the regeneration was obtained completely by adding metal ion chelating agents such as EDTA or competitor compounds as free histidine or imidazole [13].

We have previously immobilized on hybrid bilayers (HB) a unique supramolecular assembly of a redox protein with nucleic acids, called P-DNA blocks. The stability of this assembly was strengthened by reconstituting the complex below the transition phase of the lipid matrix. In this configuration, we have demonstrated that the P-DNA design offers the possibility to accurately control the density of immobilized probes on the bio-mimetic layer and optimize the DNA chip sensitivity and specificity [10;14]. These results have open the way for the development of a new generation of biosensors that allow analysis of the modulation of DNA–DNA and DNA–RNA interactions by a large range of chemicals or biological effectors.

In this paper, we present an original structure design based on assembly of P-DNA blocks driven by specific DNA hybridization process. The resulting supramolecular assembly is called $(\text{P-DNA})_2$. $(\text{P-DNA})_2$ blocks have been conceived to reconstitute a palindromic DNA response element called Estrogen Response Element (ERE) which is recognized by the estrogen receptor (ER), a member of the nuclear receptor super-family [15]. $(\text{P-DNA})_2$ blocks were extensively characterized by gel electrophoresis and spectrophotometric measurements. Mechanisms of reconstitution of $(\text{P-DNA})_2$ complexes onto lipid matrices were intensely investigated by combining surface plasmon resonance (SPR) and atomic force microscopy (AFM). From our knowledge, this is the first study presenting in parallel a global analysis and nanoscale characterizations of bio-molecular building blocks on exactly the same gold substrate (commercial gold chip). These complementary investigations allowed to establish a biosensor devoted to the study of DNA-protein interactions which are illustrated herein in the case of estrogen receptors.

2. Results

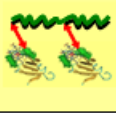


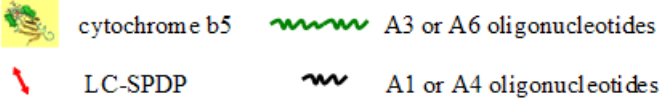
2.1. P-DNA supramolecular buildings

Constructions of molecular structures presenting DNA were performed in three steps:

(i) cross reaction between ssDNA and Succinimidyl 6-[3'-(2-PyridylDithio)-Propionamido] hexanoate (LC-SPDP), (ii) coupling of cytochrome b5 with LC-SPDP-ssDNA entities to form P-DNA blocks and (iii) dimerization of P-DNA through hybridization to form (P-DNA)₂ blocks. The first two steps of synthesis that lead to P-DNA blocks were previously established [14]. Briefly, efficiency of hetero-bifunctional linker/DNA coupling was evaluated by spectrophotometric measurements and analyzed in the presence of excess DTT. In our study, the efficiency of A1/LC-SPDP coupling was 80% and A4/LC-SPDP was 75%. Then, these modified oligonucleotides were incubated with the genetic engineered cytochrome b5. A unique and highly specific protein / linker coupling was obtained due to the cystein at position 24. Unreactive compounds were eliminated by a combination of chromatographic steps (see materials and methods part) leading to highly purified P-DNA blocks. All the steps of synthesis were characterized by spectrophotometric measurements. We have determined optimal conditions to generate (P-DNA)₂ blocks, various molecular ratios of P-DNA and overlapped complementary oligonucleotides have been tested (see supplementary result 1).

After hybridization and gel filtration processes, the composition of b5-DNA populations was determined by analysis of absorbance ratios (A_{260}/A_{412}) (Table 1).

Table 1. Presentation of different species of P-DNA assemblies. The P-DNA assembling by hybridization process can lead to the building of three species: i) complexes (A1/LC-SPDP/b5)₂-A3 or (A4/LC-SPDP/b5)₂-A6 called respectively (P-DNA)₂^{ERE} and (P-DNA)₂^{Ctrl}, ii) (A1/LC-SPDP/b5)-A3 or (A4/LC-SPDP/b5)-A6 (with only one b5) called respectively P-(DNA)₂^{ERE} and P-(DNA)₂^{Ctrl} and iii) A1/LC-SPDP/b5 or A4/LC-SPDP/b5 called respectively P-DNA^{ERE} and P-DNA^{Ctrl}.

Structure			
Name	(P-DNA) ₂ ^{ERE} or (P-DNA) ₂ ^{Ctrl}	P-(DNA) ₂ ^{ERE} or P-(DNA) ₂ ^{Ctrl}	P-DNA ^{ERE} or P-DNA ^{Ctrl}
ERE	2	1	0
MW	75000	50000	25000
Ratio A_{260}/A_{412}	3.7	7	3
Legend			

Excess of P-DNA blocks corresponded to optimal conditions to synthesize (P-DNA)₂ block majority (see supplementary result 1).

2.2. Building of the lipidic chip

2.2.1. SPR characterization

The step-by-step construction of the biochip was followed by SPR. The hydrophobic monolayer (OM) was wetted by a pulse of ethanol (50%) and washed with a non-ionic detergent, Octyl-Glucopyranoside (OG). These steps allowed cleaning the surface before the fusion of the Small Unilamellar Vesicles (SUVs). SUV were afterwards injected and, during the interaction with the surface, they spread spontaneously until reaching a plateau after 1200s. Injection was continued in order to completely form a lipidic monolayer. At the end of the fusion of SUVs onto the Self-Assembled Monolayer (SAM), two pulses of sodium hydroxide (20 mM) were used to remove lipid excess and to establish a stable dense layer. At the end of the process, the surface density of DMPC/DOGS 10% was 270 ± 0.40 pmol/cm² (Figure 1a).

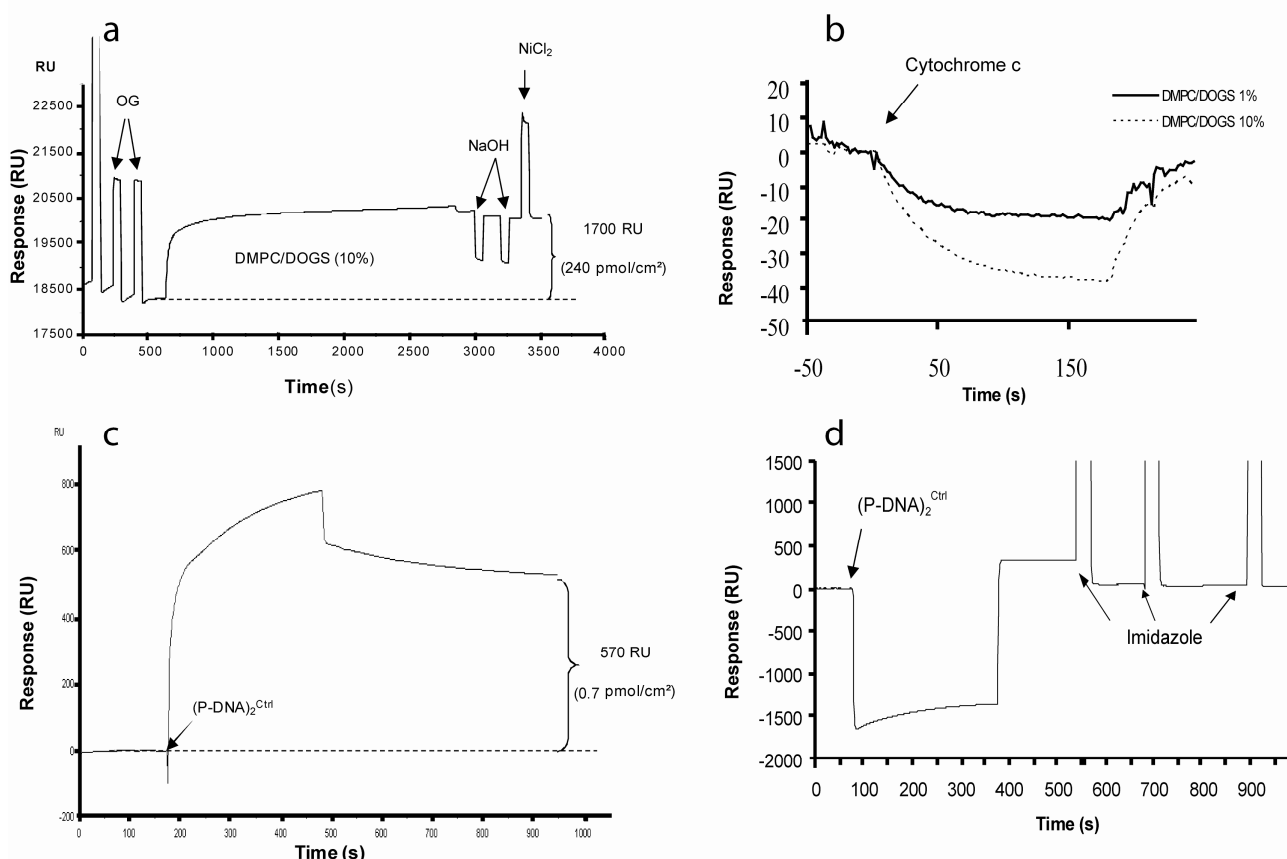
It is important to keep in mind that this entire process can be affected by some parameters (roughness of the substrate, atmospheric pollutions...) which can imply heterogeneity of the lipidic up-layer. For example, some holes could permit adsorption of molecules directly on the bare gold surface or on Octadecyl Mercaptan (OM) monolayer. SPR studies of the spreading and fusion are not sufficient to guarantee the integrity of the HB. We automatically performed controls by using a dummy protein that mimics the potential non-specific adsorption of the cytochrome b5 with the biochip. The main binding force was the hydrophobicity generated by the SAM down layer. The secondary forces were electrostatic interactions that can be attenuated by using a buffer with a high ionic strength. In our approach, we chose cytochrome c because of its similar conformation with cytochrome b5 (length of amino acid primary sequence, globular structure, porphyrin moiety...). Thus our procedure contains an internal marker which prevents the using of defective chips. For more than 80% of tested chips, the cytochrome c binding signals did not exceed the acceptable baseline drifts (1 RU/min) (Figure 1b).

Purified (P-DNA)₂^{Ctrl} has been injected and quantified after assembling on the lipidic layer (Figure 1c). The mechanism of interaction of (P-DNA)₂ with HB was determined by fitting association/dissociation results with kinetic models. Optimal fitting was obtained using the "Bivalent analyte" model (*BiaEvaluation* 3.05 software). (P-DNA)₂ blocks bind sequentially with two lipidic anchors conferring high stability of the DNA probes (see supplementary result 2).

When (P-DNA)₂^{Ctrl} was added at the μ M range, the saturation of anchorage was usually achieved 30 min after injection yielding a maximum grafting of 800 RU, i.e closed to 10 fmole/mm² (data not shown).

In order to confirm the specificity of (P-DNA)₂^{Ctrl} anchorage, 10 μ L (20 μ L/min) of 0.5 M imidazole solution, a specific histidine competitor, were injected and produced a quasi complete regeneration step (i.e. more than 90% of (P-DNA)₂ released) (Figure 1d).

Figure 1. Specific assembling of (P-DNA)₂ onto the chip. (a) Sensorgram of the hybrid bilayer establishment. This HB was realized at 25°C, on functionalized gold surface in PB buffer. SAM was first wetted with 50% ethanol, and then washed with two pulses (1 min each) of 40 mM OG at 50 µl/min. 1 mM SUV (DOGS/DMPC 10% mol/mol) was injected at 2 µl/min and spread onto the cleaned surface. At the end of the injection, flow was increased to 20 µl/min and two pulses of 20 mM NaOH treated the lipidic surface in order to remove excess vesicles. DOGS were reloaded in Ni²⁺ by an injection of NiCl₂ (20 mM in acetate buffer). At the end of this process, the response signal was ~1700 RU corresponding to 240 pmol/cm², (b) The sensorgram shows the control of the homogeneity of the HB through injections at 20 µl/min of a dummy protein (cytochrome C 1 µM). (c) Sensorgram of the (P-DNA)₂^{Ctrl} anchorage. This step was realized in PBS running buffer at 25°C at a concentration of 2 µM during 5 minutes at 5 µl/min. (d) Sensorgram showing the specific anchorage of the (P-DNA)₂ block. The lipidic surface was regenerated by three pulses of 0.5 M imidazole (30 seconds at 20 µl/min).



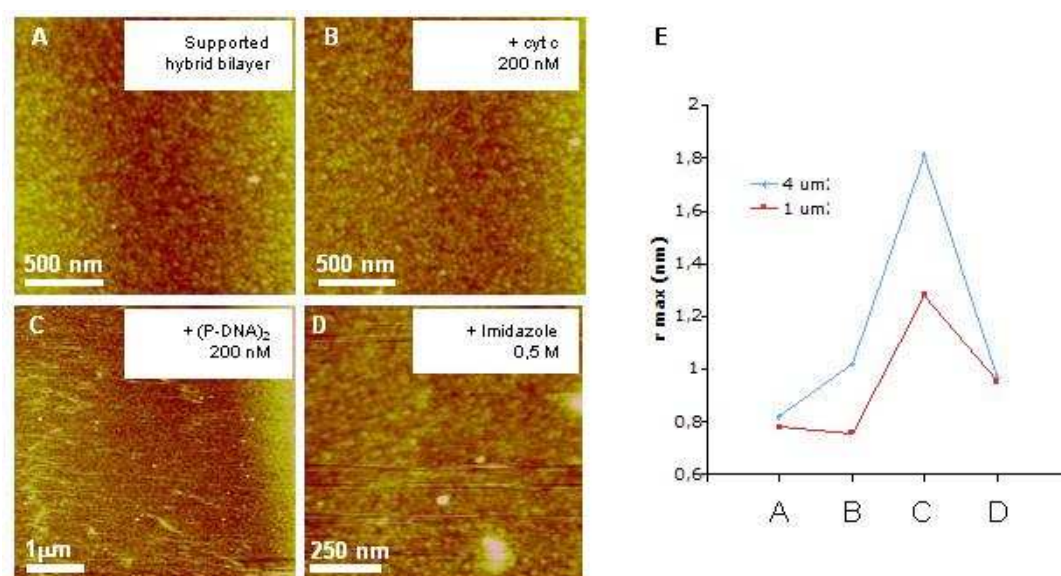
2.2.2. AFM characterization of (P-DNA)₂ complexes immobilized onto the supported HB

To be relevant when compared to the SPR characterization, we chose to process AFM imaging on the same commercial gold chips used for SPR experiments.

Indeed, visualizing how supramolecular complexes behave onto the SPR-used gold supported membrane could help understanding interactions occurring closed to the surface. First, the surface of the hydrophobic gold chip was imaged, and revealed a rough surface presenting globular gold particles of around 30 nm in diameter. Second, the establishment of the supported hybrid membrane (before and after sodium hydroxide cleaning) has been investigated on small and large areas (see supplementary result 3). From the homogeneous lipidic surface, we studied the potential of (P-DNA)₂ to bind specifically through histidine/nickel interactions.

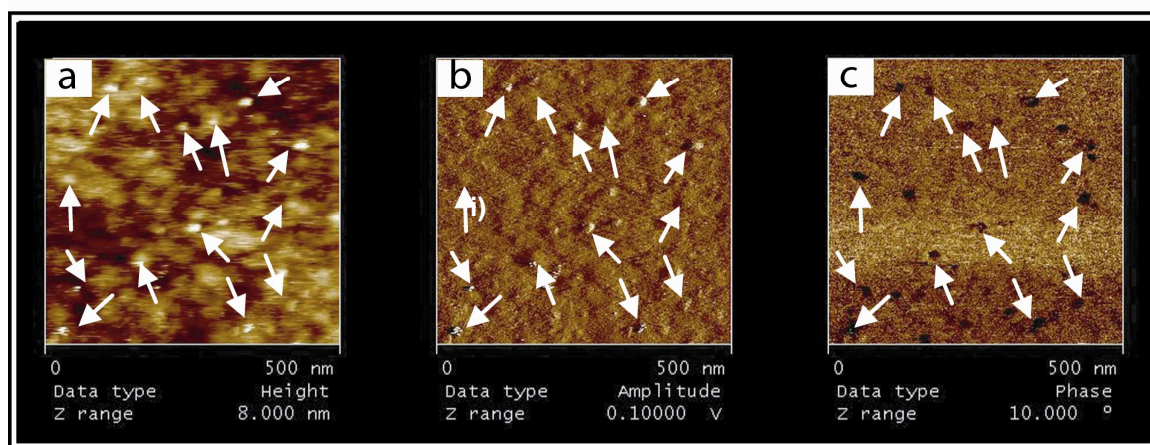
At this step, it should be mentioned that high resolution imaging of molecular assemblies on rough surface represents a challenge. Indeed, the flatter the surface the higher resolution of images obtainable. Nevertheless, it was of particular interest to visualize molecular interactions that occurs on the same surfaces employed for SPR experiments in order to connect these investigations to a realistic approach for biosensors. Thus, after (P-DNA)₂ binding to the supported hybrid membrane, the surface modification and the grafting specificity were analyzed. While incubation with cytochrome c (200 nM) had no effect on the surface appearance (Figure 2b, that is confirmed by roughness measurements Figure 2e), (P-DNA)₂ presentation to the surface induced a surface modification (Figure 2c), and an increase of the roughness (Figure 2e). Images obtained in contact mode showed a surface change with a slight dragging of motifs over the surface (Figure 2c). Washing the surface with 0.5 M imidazole (Figure 2d) allowed to regenerate with good efficiency the surface. The surface roughness calculation, at these different steps confirmed these observations (Figure 2e) proving both specificity and reversibility of (P-DNA)₂ complex binding.

Figure 2. Specificity and reversibility of the biosensor. AFM images of gold supported HB after DOGS reloading in Ni²⁺ (a) after 20 min incubation of 200 nM cytochrome c (b), (P-DNA)₂ (c) and after imidazole incubation (d) obtained by contact mode imaging in liquid conditions. (e) Surface roughness (in nm) was determined on every image, on 1 and 4 μm². z range corresponds to 15 nm in contact mode.



After reloading DOGS with 50 mM nickel solution and a 20 min incubation with (P-DNA)₂, oscillating contact mode AFM images at higher resolution showed globular motifs with a size corresponding to the size of a (P-DNA)₂ complex (length ~18nm) (Figure 3a). Amplitude and phase representations were also recorded in order to discriminate (P-DNA)₂ more clearly from the surface (Figure 3b, c). A nice correlation between height, amplitude and phase signals confirmed the binding of (P-DNA)₂ complexes onto the surface.

Figure 3. Visualization of (P-DNA)₂ complexes immobilized onto the supported HB. The height (a) amplitude (b) and phase (c) representations from oscillating contact mode AFM images are nicely correlated after (P-DNA)₂ incubation on the HB. White arrows indicate motifs. The supported membrane contains 1% nickel modified lipids and was reloaded with a 50 mM nickel solution in acetate buffer. The (P-DNA)₂ complexes were incubated for 30 min onto the membrane, followed by extensive washes with PBS buffer.



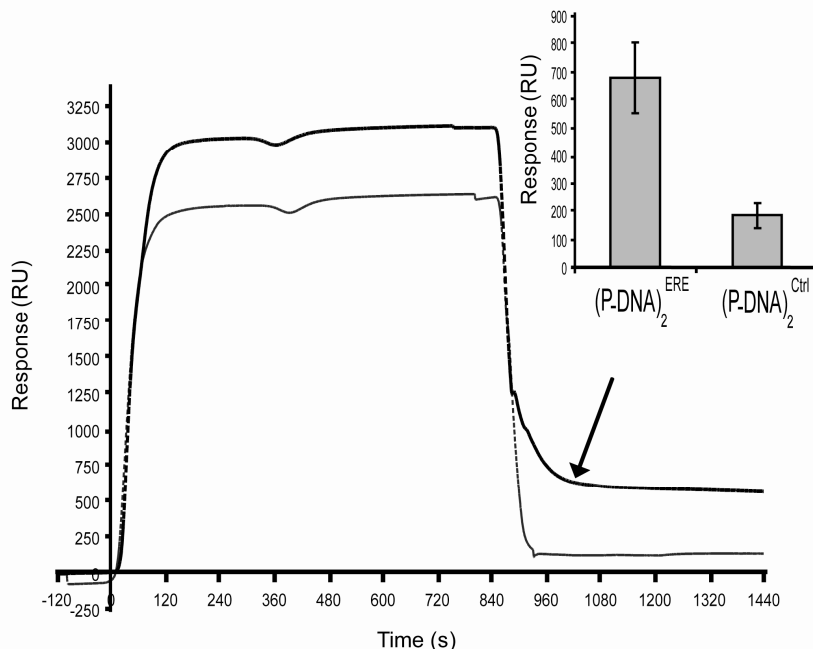
These nicely correlated results show that experiments at “molecular scale” (on 500x500 nm, thus $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ mm}^2$ by AFM) represents a fine approach relating specificity and reversibility of molecular interactions. Thus, SPR and AFM results, while investigating the same surface but at different scales (1.4 mm^2 and $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ mm}^2$ respectively) are coherent.

2.2.3. Paradigm of estrogen receptor sensor

Following the previous procedures, two populations of purified (P-DNA)₂ blocks can be grafted on lipidic chips leading to the establishment of an estrogen receptor biosensor including ERE and reference channels in Biacore 2000 apparatus.

(P-DNA)₂^{Ctrl} and (P-DNA)₂^{ERE} were immobilized on the lipid matrix reconstituted on functionalized gold sensor chips leading to a homogeneous loading of 150 RU for each species. Activated estrogen receptor (50 nM ER α with 1 nM E₂) was injected and molecular interactions followed in real time (Figure 4).

Figure 4. Specific interaction between ER α and ERE target sequence. After 4 hours incubation of 50 nM ER α with 1 nM E₂ in PBS at 4°C, 300 μ l of “activated” receptors were injected at 20 μ l/min on (P-DNA)₂^{ERE} (thick curve) or on (P-DNA)₂^{Ctrl} (thin curve). The graphic representation of the results was the mean of four experiments.



The level of association was highest on the ERE channel and dissociation event occurred on this channel whereas none was observed on the reference (control sequence) indicating a dynamic equilibrium between DNA target and protein probes. Finally at the end of ER α injections, mean values were more than 3.6 fold higher on ERE target than on control sequence (680 RU \pm 127 (10,2 fmol/mm²) versus 186 RU \pm 45 (2,8 fmol/mm²) respectively). The biosensor can be regenerated at the hybrid layer level by a clearing process of ER/(P-DNA)₂ with two pulses of 0.5 M imidazole (data not shown).

3. Discussion

In the present study, a population of engineered protein derived from human microsomal cytochrome b5 specifically linked to an oligonucleotide with a hetero-bifunctional linker was synthesized to yield a building block called P-DNA. P-DNA was a versatile molecular block able to promote the formation of taller and highly controlled nano-objects. Many strategies can be used to obtain such supramolecular structures including (i) hybridization in solution followed by chromatographic steps or (ii) solid-phase synthesis strategy. Recently, the latter option was successfully used to construct large P-DNA blocks in a DNA network project [16]. In our study, reconstitution in solution was convenient in regard to the final molecular assembly. Thus, P-DNA blocks were incubated in an optimized procedure with long overlapping complementary oligonucleotides to give an unique supramolecular block called (P-DNA)₂. At the end of hybridization process, excess P-DNA was easily separated by gel exclusion chromatography and complexes of interest were detected by non-denaturing electrophoresis. Specific stains revealed nucleic and protein parts of these blocks (see supplementary result 1). Each (P-DNA)₂ block presented two tags with the –NGHHH-COOH sequence

which allow the interaction with two lipid anchors (DOGS) through coordinated histidine/nickel binding. Thermodynamically, this structure is more strongly associated with the lipidic matrix than P-DNA and the mechanism of association/dissociation fits well with a kinetic model of “bivalent analyte” as shown in SPR experiments. Moreover, Stenberg’s calibration, in SPR experiments, demonstrated that 1000 RU corresponds to 1 ng/mm^2 of protein [17]. The amount of complexes covering the lipidic membrane as determined from SPR results was estimated taking into account molecular mass and area of 75 kDa and 100 nm^2 respectively for the $(\text{P-DNA})_2$ blocks. Based on these theoretical dimensions, the maximum $(\text{P-DNA})_2$ coverage achieved was 16.6 fmoles/mm^2 or 1250 RU. The amount of 1% of DOGS lipid represented the smaller amount of DOGS leading to complete $(\text{P-DNA})_2$ immobilization. Upper limit was raised to 10% DOGS lipid content in order to magnify the amount of $(\text{P-DNA})_2$ blocks immobilized. Experimental SPR data did not exceeded 800 RU following the injection of $(\text{P-DNA})_2$ blocks, which corresponds to 10 fmoles/mm^2 . Dissociation occurs at this level of loading and stabilization of the interactions was observed below 6 fmoles/mm^2 . The phenomenon of dissociation of P-DNA has previously been demonstrated and resulted from both the rupture of the chelate-mediated link and the extraction of lipid anchors from the lipidic matrix [14]. This major drawback was overcome by using two tags per $(\text{P-DNA})_2$ block. However, $(\text{P-DNA})_2$ blocks did not bind simultaneously with two DOGS. According to the availability of free DOGS in the lipid matrix, a part of them could link only one anchor domain. These “not fully bound” blocks were probably released from the surface during experiments. On the other hand, when ER sensors were established, regeneration processes using competitors of Ni^{2+} coupling or Ni^{2+} chelating agents were efficient as shown both in SPR and AFM investigations.

In order to better understand events that occur at the surface of the biochip, we performed AFM investigations of substrate employed for SPR experiments. The relevancy and originality of the present imaging study lies on the fact that visualization of specifically immobilized $(\text{P-DNA})_2$ complexes was performed on the same commercial gold chips used for SPR characterizations. While this substrate presents a rough surface, far rougher than the flat mica usually used for AFM imaging, we managed to visualize $(\text{P-DNA})_2$ complexes immobilized on a hybrid membrane and to demonstrate the specificity and reversibility of this grafting. SPR and AFM results support the model of $(\text{P-DNA})_2$ complexes immobilization through histidine/nickel interactions. Indeed, in both methods, grafting of $(\text{P-DNA})_2$ blocks is: i) DOGS membrane content dependent, ii) surface specific and iii) reversible. The combination of both techniques is still a challenge. Indeed, very few studies argue for the use of the AFM tool to visualize the organization of proteins on the same working surface. Indeed, in literature we can find AFM characterization study of sensors based on quartz crystal [12] or gold electrode [18]. But, in the first case [12], AFM experiments were actually performed on atomically flat mica, which is a deeply different surface (flat mica versus rough gold substrates). In the other study [18], while gold electrode presents a clear roughness (islands of 300 nm [19]), their AFM observations were performed on atomically flat gold (Au (111)-(1x1)). Thus, it appears not evident at all to visualize by AFM molecules and their interactions “strictly on the sensor surface”. This increases the weight of our study, since we revealed $(\text{P-DNA})_2$ complexes specifically and reversibly immobilized on similar lipid surface reconstituted on gold chip through both SPR and AFM methods.

Another challenge concerns the imaging of macromolecular complexes linked to a lipidic carriers in a lipid bilayer [20]. The lateral mobility of chelating lipids allows (P-DNA)₂ complexes to move in the plane of membrane. Such a behavior makes high resolution imaging of complexes more difficult. Our AFM images, while highly demonstrative, are probably limited in terms of resolution due to this diffusion. At this stage, it is important to note that our biosensor offers through its structure (hybrid bilayer) the possibility to overcome this drawback. Decreasing the working temperature would indeed rigidify the supported membrane (phase transition between liquid and gel states still exist with few % of DOGS in DMPC hybrid bilayers as previously demonstrated [14]), thus limiting mobility of (P-DNA)₂ blocks).

In order to realize an estrogen receptor biosensor, we have built two populations of (P-DNA)₂ blocks presenting respectively the specific palindromic DNA estrogen response element (ERE) and a control DNA (ctrl). In preliminary experiments, these populations were reconstituted on the HB at a level of 2 fmoles/mm² (around 150 RU). On the other side, the binding of ligand (such as E2) to the estrogen receptors induces their dimerization. This conformational change induced activation of ER and their interaction with the ERE sequence. Moreover ER α protein is known to be really difficult to store. This nuclear receptor is particularly sensitive to the denaturizing and aggregating processes [21]. Every authors working on SPR based ER/ERE interactions studies used the same ER α origin which was commercialized at 80% of purity and could be denaturized or aggregated with time [22-27]. In our study, the activated ER interacts with the DNA biosensor during injection steps and especially with the ERE sequence. This was illustrated in figure 4, where few minutes after the end of injection, 10.2 fmol/mm² of activated ER α have strongly interacted with specific ERE target whereas unspecific linkage to control sequence reached 2.8 fmol/mm². Whereas, due to the large variability of the control sequences in others publications, it was difficult to compare ER α /control DNA interaction responses. The level of unspecific signal (27%) obtained with our biosensor was in the range of previous publications presented results with control sequences (between 10 to 50%) [22;24;26;28].

Moreover, a particular result of our biosensor must be pointed out. (P-DNA)₂ surface coverage has been fixed to 2 fmole/mm² which corresponded to 4 fmole/mm² of ERE immobilized on the lipidic matrix. When activated ER was injected at 50 nM during 15 min, the specific signal of ER/ERE interactions reached a plateau at 490 RU, i.e. around 0.49 ng/mm² or 7.4 fmoles/mm². In these conditions the efficiency of RE/ERE biorecognitions was up to 90%. These first results on protein/DNA interactions based on this biomolecular architecture seem to be promising and will be further investigated. Finally regeneration of RE/ERE biosensors were usually based on dsDNA stripping or denaturizing protein processes [23;25]. Our biochip offers an alternative to these methods which allow overcoming the unspecific adsorption on DNA. (P-DNA)₂ blocks linked to ER by affinity anchorage were simply eliminated by imidazole pulses, offering a lipidic matrix available for a new DNA grafting. These preliminary results allowed us to conclude that ER α interaction is mainly ERE specific, which confers biological relevancy to our biosensor.

4. Experimental Section

4.1. Materials

LC-SPDP (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) was used to link oligonucleotides to modified cytochrome b5 reduced by 1,4-DithioTreitol (DTT) (Sigma Saint Louis, USA). Oligonucleotides (Eurogentec, Liege, Belgium) were able to create ERE or double strand control sequence (Ctrl) by complementary hybridizations (A1/A3 and A4/A6). P-DNA structures were purified by chromatography using DiEthylAminoEthyl (DEAE), IminoDiacetic Acid (IDA) and Sephadex G75 gels purchased from Sigma. Lipid surfaces were constituted by a mixture of DiMyristoyl-Phosphatidyl-Choline (DMPC) and 1,2-DiOleoyl-sn-Glycero-3[(N(5-amino-1carboxypenty) iminodiacetic acid)] Succinyl (DOGS) (Aventi Polar Lipids, Albaster, USA). Human recombinant Estrogen Receptor- α (ER α) (PanVera, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) was conserved at -80°C into 10 μl aliquots to limit the number of freeze-thaw cycles. Estradiol-17- β (E₂) (Sigma, St Louis, USA) was prepared at 1 μM in ethanol and stored at -20°C .

4.2. Supramolecular building

A1 (5'-AGTTCTTTGATCAGGTCACCTGTGACCTGAACTTGCT-3') ($\epsilon_{260\text{nm}} = 334.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) or A4 (5'-AGTTCTTTGATACGTCCCATCAAGTCAGACTTGCT-3') ($\epsilon_{260\text{nm}} = 335.900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) oligonucleotides were coupled to LC-SPDP by incubation for 17 hours in 50 mM phosphate buffer pH 7.5 (called PB) at room temperature with 1/25 molecular ratio. Excess LC-SPDP was eliminated by ion exchange chromatography (DEAE) in PB buffer. Oligonucleotides linked to the column were eluted with 1 M NaCl in PB buffer. Coupling efficiency was evaluated in reducing conditions (20 mM DTT). This reducing agent cleaves LC-SPDP, releasing thiopyridine which was quantified by spectrophotometry at 343 nm. The genetically engineered cytochrome b5 was previously described [29]. Briefly, a S24C mutation has been introduced, by directed engineering, to enable protein / linker coupling. Then, a tag of six amino acids (NGHHH) was added at the C-terminus to allow IMAC chromatography processes and grafting on DOGS.

DNA/LC-SPDP complexes were coupled to modified cytochrome b5 ($\epsilon_{412\text{nm}} = 117.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) through sulfhydryl residue bearing by the unique cystein at position 24. This cystein was reduced by a 10-minute incubation at room temperature in DTT excess (1/10 mole/mole), which was eliminated by exclusion chromatography (Sephadex G25). DNA/LC-SPDP complexes were incubated with modified cytochrome b5 (molecular ratio 1/1) at room temperature overnight, after which DNA/LC-SPDP/b5 complexes (called P-DNA) were purified in several steps. First, complexes without cytochrome b5 were eliminated by affinity chromatography with an iminodiacetic acid column loaded using a NiCl₂ solution (0.1 M acetate buffer pH 7.8). All cytochrome b5, bearing DNA or not, were eluted by 1 mg/ml histidine solution (PB buffer). Then P-DNA complexes were purified by ions exchange chromatography. Free cytochrome b5 were eliminated by 0.25 M NaCl (PB buffer) and P-DNA were eluted in 1 M NaCl (PB buffer). Complexes were quantified by spectrophotometric measurements at 260 and 412 nm.

A dimerization process was based on the complementary hybridization properties of DNA that lead to a structure called the (P-DNA)₂ block. A3 (5'-

AGCAAGTTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAAGAATATATAGCAAGTTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAAGA-3') ($\epsilon_{260\text{nm}} = 735.700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) or A6 (5'-AGCAAGTCGTGACTTGATGGGACGTATCAAAGAATATATAGCAAGTCGTGACTTGATGGGACGTATCAAAGA-3') ($\epsilon_{260\text{nm}} = 739.900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) oligonucleotides, which presented two complementary domains with respectively A1 and A4 sequences, were able to link two P-DNA complexes. Two molecular ratios between A3 or A6 and corresponding complexes were used to evaluate the most efficient dimerization process. One mole ssDNA with 3 moles of P-DNA at 4°C in PB buffer overnight. Theoretically hybridization process can lead to the building of three species: i) complexes (A1/LC-SPDP/b5)₂-A3 or (A4/LC-SPDP/b5)₂-A6 called respectively (P-DNA)₂^{ERE} and (P-DNA)₂^{Ctrl}, ii) (A1/LC-SPDP/b5)-A3 or (A4/LC-SPDP/b5)-A6 (with only one b5) called respectively P-(DNA)₂^{ERE} and P-(DNA)₂^{Ctrl} and iii) A1/LC-SPDP/b5 or A4/LC-SPDP/b5 called respectively P-DNA^{ERE} and P-DNA^{Ctrl}. These different species were separated by gel filtration (Sephadex G75, 0.1 M Phosphate Buffer Saline (PBS)). Spectrophotometric study was used to identify these different species by determining the characteristic A₂₆₀/A₄₁₂ ratio.

4.3. Assembling of complexes onto the chip

First, commercial gold chips SIA (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA) were chemically functionalized in 1 mM OM (Sigma, Saint Louis, USA) at room temperature overnight as previously published [9]. Then, 1 mM (DMPC)/(DOGS) SUVs were prepared by extrusion using a 50 nm polycarbonate membrane in PB buffer. Several DOGS/DMPC ratios were used in this study, from 0.01 to 0.1 range mole/mole, in order to modulate (P-DNA)₂ surface density. After wetting the hydrophobic SAM with 50% ethanol, the surface was washed with 40 mM OG. Lipid vesicles spread spontaneously onto the hydrophobic surface at 25°C. Excess lipid was removed by treatment with 20 mM NaOH leading to a stable baseline. Injections of (P-DNA)₂ onto this lipidic surface was performed at 5 µl/min.

4.4. ERα/ DNA interaction

Interaction study was performed after 50 nM ERα dimerization in the presence of 1 nM E₂ (4 hours incubation in PBS at 4°C). Then, receptor solution was simultaneously injected onto both (P-DNA)₂^{Ctrl} and (P-DNA)₂^{ERE} channels at 2 µl/min for 15 minutes.

4.5. SPR experiments

SPR experiments were run on BIAcore 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA) at 25 °C, with a flow rate of 5–50 µl/min, in PB buffer or in PBS for (P-DNA)₂ graftings and ERα interaction experiments.

4.6. Spectrophotometric characterizations

Spectrophotometric study with a λ900 spectrophotometer (PerkinElmer Instrument, Waltham, USA) was performed to identify P-DNA species. For calculations, absorbance at 260 nm had to be corrected to take into account the contribution of cytochrome b5 at this wavelength (about 17% of the 413 nm absorbance value). Molar extinction coefficient at 260 nm of DNA component in (P-DNA)₂^{ERE}

complexes, for example, was $\mathcal{E}_{(A1)_2 - A3260nm} = \frac{2 \times \mathcal{E}_{A1260nm} + \mathcal{E}_{A3260nm}}{1.67}$, so global coefficient at 260 nm for (P-DNA)₂^{ERE} was $\mathcal{E}_{(P-DNA)_2ERE260nm} = \mathcal{E}_{(A1)_2 - A3260nm} + 2 \times \mathcal{E}_{b5260nm}$. For P-(DNA)₂^{ERE} molar extinction coefficient at 260 nm of DNA part was $\mathcal{E}_{A1 - A3260nm} = \frac{\mathcal{E}_{A3260nm}}{2} + \frac{\frac{\mathcal{E}_{A3260nm}}{2} + \mathcal{E}_{A1260nm}}{1.67}$, so global coefficient of P-(DNA)₂^{ERE} was $\mathcal{E}_{P - (DNA)_2ERE260nm} = \mathcal{E}_{A1 - A3260nm} + \mathcal{E}_{b5260nm}$. Molar extinction coefficient of P-DNA^{ERE} was $\mathcal{E}_{P - DNAERE260nm} = \mathcal{E}_{A1260nm} + \mathcal{E}_{b5260nm}$. The coefficient at 412 nm was only affected by number of cytochrome b5 molecules. Each species present a characteristic molar extinction coefficient ratio. Thus, all complexes could be discriminated by determining the A_{260nm}/A_{412nm} ratio (Table 1).

4.7. AFM characterizations

The AFM used was a Nanoscope III (Veeco, Santa Barbara, CA). Imaging was performed in contact and oscillating contact mode (tappingTM mode) using NPS-oxide sharpened silicon nitride probes (Veeco) exhibiting spring constants of 0.32 N/m or 0.58 N/m at resonance frequencies of 8.5 to 9.5 kHz. For the feedback controls, typical values of set-point for imaging were between 0.5 to 1.5 V, depending on scan size and drive amplitude in oscillating contact mode. The oscillation amplitude was generally maintained at 5-10 nm away from the surface.

5. Conclusions

To conclude, a macromolecular assembly, called P-DNA, composed of an engineered cytochrome b5 and a modified ssDNA was synthesized and characterized. Using a complementary oligonucleotide, we have demonstrated the possibility to generate a supramolecular assembly called (P-DNA)₂. The optimal conditions to synthesize these blocks have been established. These blocks were reconstituted on a bio-functionalized gold chip and investigated in parallel with two biophysical techniques, Surface Plasmon Resonance (SPR) and Atomic Force Microscopy (AFM). From our knowledge, this is the first time that such investigations are performed in parallel on the same substrate, i.e. rough gold substrate devoted to biosensors. The construction and properties of the sensor were confirmed with both techniques, especially in term of specificity and reversibility. We guess that such approach brings sensor and nanotechnology communities in helping a better understanding of events that occur at the surface of biochip. Finally, an estrogen receptor biosensor was performed. These first results of specific biomolecular recognitions between ERE - the DNA response element -, and ER - a member of the nuclear receptor super-family - open up a new approach for developing an estrogen receptor biosensor and for drugs screening.

Acknowledgements

This work was supported by a French fellowship PPF “Microtechniques for Proteomic” from Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). The authors thank Dr. Jonne HELENIUS for reviewing the English.

References and Notes

1. Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **1996**, *271*, 43-48.
2. Tanaka, M.; Sackmann, E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **2005**, *437*, 656-663.
3. Larsson, C.; Bramfeldt, H.; Wingren, C.; Borrebaeck, C.; Hook, F. Gravimetric antigen detection utilizing antibody-modified lipid bilayers. *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 72-80.
4. Suraniti, E.; Tumolo, T.; Baptista, M.S.; Livache, T.; Calemczuk, R. Construction of hybrid bilayer membrane (HBM) Biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and HBM. *Langmuir* **2007**, *23*, 6835-6842.
5. Svedhem, S.; Dahlborg, D.; Ekeröth, J.; Kelly, J.; Höök, F.; Gold, J. In Situ Peptide-Modified Supported Lipid Bilayers for Controlled Cell Attachment. *Langmuir* **2003**, *19*, 6730-6736.
6. Proux-Delrouyre, V.; Elie, C.; Laval, J.M.; Moiroux, J.; Bourdillon, C. Formation of Tethered and Streptavidin-Supported Lipid Bilayers on a Microporous Electrode for the Reconstitution of Membranes of Large Surface Area. *Langmuir* **2002**, *18*, 3263-3272.
7. Worsfold, O.; Toma, C.; Nishiya, T. Development of a novel optical bionanosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1505-1511.
8. Dorn, I.T.; K., P.; Pettinger, S.C.; Tampé, R. Orientation and two-dimensional organization of proteins at chelator lipid interfaces. *Biological Chemistry* **1998**, *379*, 1151-1159.
9. Pack, D.W.; Chen, G.; Maloney, K.M.; Chen, C.T.; Arnold, F.H. A metal-chelating lipid for 2D protein crystallization via coordination of surface histidines. *Journal of American Chemical Society* **1997**, *119*, 2479-2487.
10. Boireau, W.; Bombard, S.; Sari, M.A.; Pompon, D. Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77*, 225-231.
11. Courty, S.; Lebeau, L.; Martel, L.; Lenné, P.F.; Balavoine, F.; Dischert, W.; Konovalov, O.; Mioskowski, C.; Legrand, J.F.; Vénien-Bryan, C. Two-Dimensional Crystallization of a Histidine-Tagged Protein on Monolayers of Fluidity-Enhanced Ni²⁺-Chelating Lipids. *Langmuir* **2002**, *18*, 9502-9512.
12. Prachayasittikul, V.; Na Ayudhya, C.I.; Hilterhaus, L.; Hinz, A.; Tantimongcolwat, T.; Galla, H.J. Interaction analysis of chimeric metal-binding green fluorescent protein and artificial solid-supported lipid membrane by quartz crystal microbalance and atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327*, 174-182.
13. Gizeli, E.; Glad, J. Single-step formation of a biorecognition layer for assaying histidine-tagged proteins. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3995-4001.

14. Boireau, W.; Zeeh, J.C.; Puig, P.E.; Pompon, D. Unique supramolecular assembly of a redox protein with nucleic acids onto hybrid bilayer: towards a dynamic DNA chip. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1631-1637.
15. Klinge, C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2905-2919.
16. Pompon, D.; Laisne, A. PDNA as building blocks for membrane-guided self-assemblies. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 495-497.
17. Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid. Inter. Sci.* **1991**, *143*, 513-526.
18. Mayer, D.; Ataka, K.; Heberle, J.; Offenhausser, A. Scanning Probe Microscopic Studies of the Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of Cytochrome c Oxidase to a Gold Electrode. *Langmuir* **2005**, *21*, 8580-8583.
19. Miyake, H.; Ye, S.; Osawa, M. Electroless deposition of gold thin films on silicon for surface-enhanced infrared spectroelectrochemistry. *Electrochemistry Communications* **2002**, *4*, 973-977.
20. Yoshina-Ishii, C.; Chan, Y.H.; Johnson, J.M.; Kung, L.A.; Lenz, P.; Boxer, S.G. Diffusive dynamics of vesicles tethered to a fluid supported bilayer by single-particle tracking. *Langmuir* **2006**, *22*, 5682-5689.
21. Pillon, A.; Boussioux, A.M.; Escande, A.; Ait-Aissa, S.; Gomez, E.; Fenet, H.; Ruff, M.; Moras, D.; Vignon, F.; Duchesne, M.J.; Casellas, C.; Nicolas, J.C.; Balaguer, P. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: application to environmental analysis. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 278-284.
22. Cheskis, B.J.; Karathanasis, S.; Lyttle, C.R. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11384-11391.
23. Kostelac, D.; Rechkemmer, G.; Briviba, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7632-7635.
24. Peh, W.Y.; Reimhult, E.; Teh, H.F.; Thomsen, J.S.; Su, X. Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor alpha-DNA complexes: a combinational quartz crystal microbalance with dissipation and surface plasmon resonance study. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 4415-4423.
25. Su, X.; Lin, C.Y.; O'Shea, S.J.; Teh, H.F.; Peh, W.Y.; Thomsen, J.S. Combinational application of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance for studying nuclear hormone receptor-response element interactions. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5552-5558.
26. Teh, H.F.; Peh, W.Y.; Su, X.; Thomsen, J.S. Characterization of protein--DNA interactions using surface plasmon resonance spectroscopy with various assay schemes. *Biochemistry* **2007**, *46*, 2127-2135.
27. Yang, N.; Su, X.; Tjong, V.; Knoll, W. Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein-DNA binding. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2700-2706.

28. Yuan, L.; Wagatsuma, C.; Yoshida, M.; Miura, T.; Mukoda, T.; Fujii, H.; Sun, B.; Kim, J.H.; Surh, Y.J. Inhibition of human breast cancer growth by GCP (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by beta-glucuronidase from tumor tissues. *Mutat. Res.* **2003**, *523-524*, 55-62.
29. Boireau, W.; Duncan, A.C.; Pompon, D. Bioengineering and characterization of DNA-Protein assemblies floating on supported membranes. In *Methods in Molecular Biology*, Inc., T.V.-D.H.P.; Totowa, NJ, Contry, **2005**, *300*, 349-368.

© 2008 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Supplementary results 1

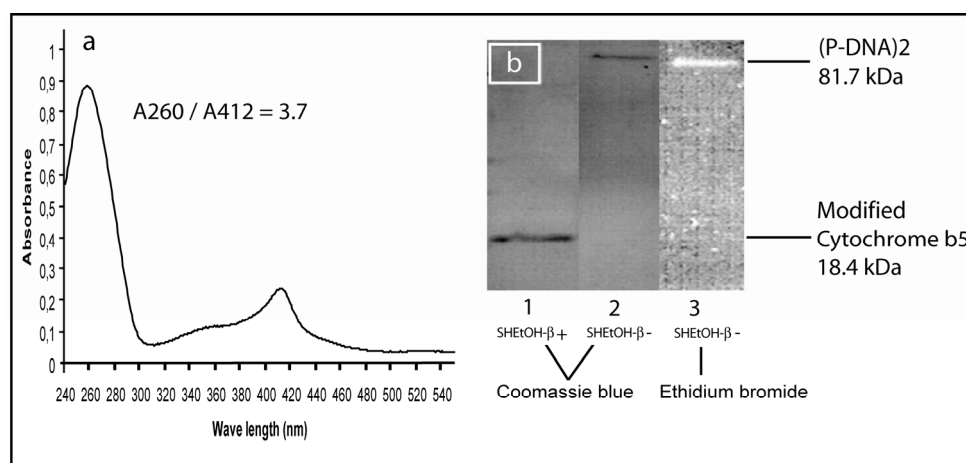
(P-DNA)₂ supra-molecular building

In order to determine optimal conditions to obtain the highest (P-DNA)₂ blocks synthesis yield, two molecular ratios of P-DNA and overlapped complementary oligonucleotides were used (2:1 or 3:1 by mole). After the hybridization and gel filtration processes, the composition of b5-DNA populations was determined by analysis of absorbance ratios (A_{260}/A_{412}) and gel electrophoresis. When a molar ratio of 2:1 was used, it leads to an incomplete synthesis of (P-DNA)₂ blocks. Hybridization in solution could not be fully performed under this experimental condition leading to an intermediate block called P-(DNA)₂. When P-DNA blocks were in excess, the equilibrium of synthesis was displaced to the synthesis of (P-DNA)₂. Residual P-DNA was completely removed by a chromatographic step.

After characterization of (P-DNA)₂ fractions by spectrophotometry ($(A_{260}/A_{412}) = 3.7$) (Figure Aa), the degree of purification was evaluated by 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were revealed by Coomassie blue and the DNA parts by ethidium bromide staining. In denaturing conditions (β -mercaptoethanol in sample buffer) only one 18 kDa structure corresponding to cytochrome b5 was observed (Figure Ab, lane 1). β -mercaptoethanol, a reducing agent, induced LC-SPDP/DNA releasing by the reduction of a disulfide bond between cytochrome b5 and LC-SPDP. To overcome this limitation, identification of b5-DNA complexes was performed in non-denaturing conditions (Figure Ab, lanes 2 and 3). Protein coloration of b5-DNA population revealed only the dimeric species (P-DNA)₂^{Ctrl} (Figure Ab, lane 2). Ethidium bromide allowed the revelation of the double strand DNA part of this structure (Figure Ab, lane 3).

Supplementary figure A: Biochemical characterizations of (P-DNA)₂ blocks.

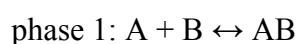
(a) Spectrophotometric UV-visible characterization of (P-DNA)₂, (b) Electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel was realized in denaturing conditions (SHEtOH-β +) (lane 1), or in non-denaturing conditions (SHEtOH-β -) (lane 2 and 3). Proteins were revealed by Coomassie blue staining (lane 1 and 2). DNA parts were revealed by an UV light exposition at 312 nm after incubation in ethidium bromide (lane 3).



Supplementary results 2

Interaction mechanism analysis of (P-DNA)₂ with HB

The mechanism of interaction of (P-DNA)₂ with HB was investigated in order to better understand the sequential steps of immobilization onto the lipidic matrix. Theoretically, (P-DNA)₂ entities present two histidine tags and thus, two sites of anchoring. The most convenient interaction kinetic model must take into account this particularity. We have faced to face association/dissociation results with “Langmuir 1:1” and “Bivalent analyte” models (Figure B). Optimal fitting was obtained using the Bivalent analysis model for all studies involving (P-DNA)₂ blocks. This model, proposed in *BiaEvaluation* 3.05 software, corresponds to the following mechanism of interaction:

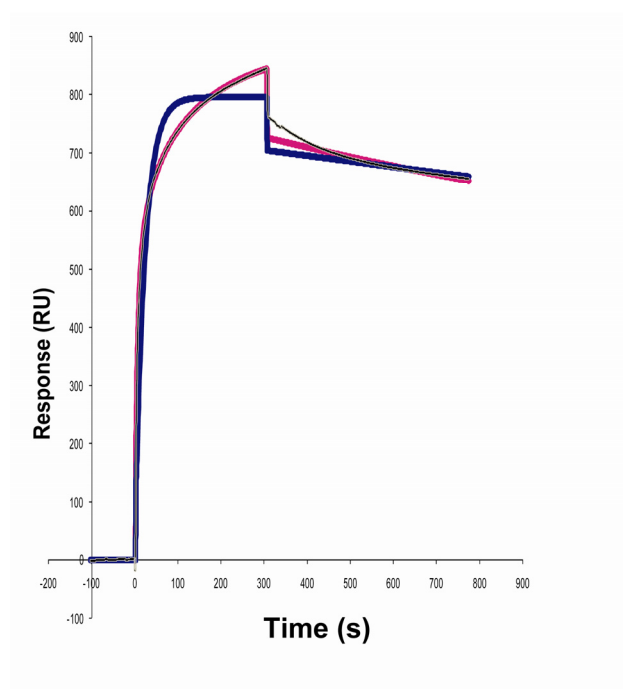


phase 2: $AB + B \leftrightarrow AB_2$ with A corresponding to the analyte “(P-DNA)₂” and B to the ligand “lipid anchor DOGS”. Thus, results of fitting are consistent with

the theory that (P-DNA)₂ initially binds to one lipid anchor (DOGS) in the lipid matrix through one of its histidine tags. This preliminary interaction with the lipid matrix leads to a free histidine tag that can react with a second lipid anchor. When DOGS were in excess in the lipid matrix, such coupling was optimized giving higher affinities than those observed for monomeric P-DNA.

Figure B: Kinetic analysis of (P-DNA)₂ grafting onto the surface.

Superimposition of kinetic models and experimental (P-DNA)₂ data. Experimental data (grey curve) and resulting fits with the Langmuir 1:1 model (blue curve) and the bivalent model (purple curve) purposed in *BiaEvaluation* 3.05.



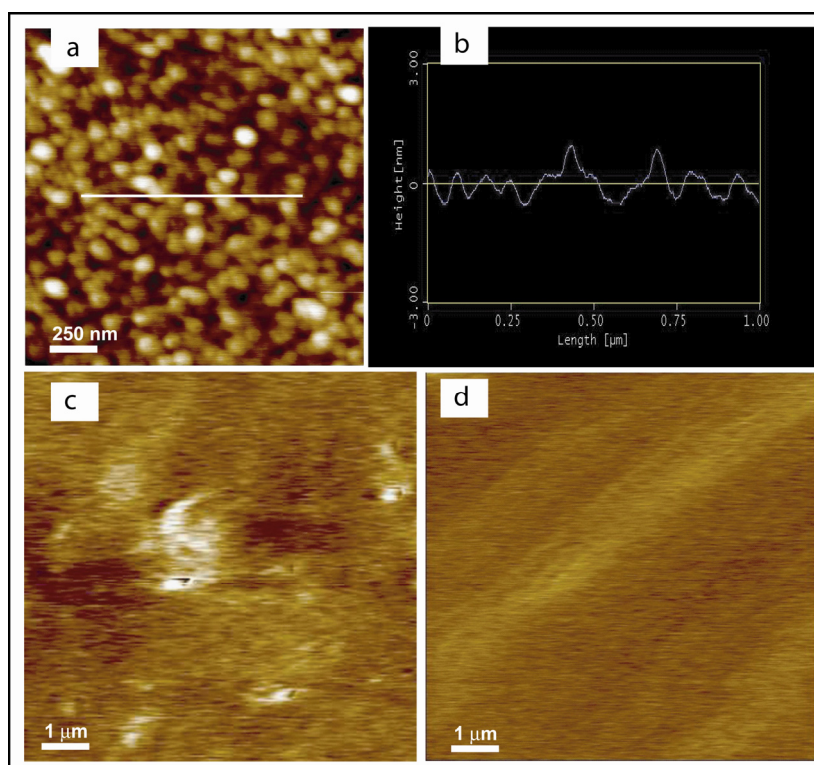
Supplementary results 3

AFM characterization of hybrid bilayer

Figure C: Establishment of supported lipid layer onto the OM modified gold surface.

(a) AFM images in contact mode of commercial gold chip surface presenting spherical particles of gold (diameters of 30 to 50 nm) (b) The profile section along the white line (on the image a). (c) Certain heterogeneity were visualized after 1h lipid vesicles fusion onto the

hydrophobic gold surface but disappeared after a short treatment with 20mM NaOH, **(d)** z scale corresponds to 8 (a) and 100 (b,c) nm.



Supplementary Method 1

Gel electrophoresis

Purification degree was evaluated by 12.5% polyacrylamide SDS-gel electrophoresis. Classical denaturing SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) was performed on 2 μg of b5-Ctrl sample. Proteins were heated to 95°C for 5 minutes in sample buffer (0.2% SDS, 0.001% bromophenol blue, 62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol and 10 mM β-mercaptoethanol (SHEtOH-β)). A non-denaturing electrophoresis was also performed on 2 μg of proteins by not heating and using β-mercaptoethanol free sample buffer. Gels were incubated in Coomassie blue solution overnight and destained for two hours in 10% acetic acid, 30% methanol solution. Next, a bath in 0.5 μg/ml ethidium bromide was performed overnight, and DNA presence was revealed by a UV light exposition at 312 nm.

1.1.2 Problèmes rencontrés.

Après avoir caractérisé le prototype lipidique, nous avons voulu appliquer ce biocapteur au criblage d'un grand nombre de molécules potentiellement estrogéniques. Cependant, la source commerciale de RE α (Invitrogen) s'est avérée présenter un inconvénient majeur. Le RE α est une protéine de nature hydrosoluble. Or, l'injection d'une nouvelle solution commerciale de RE α (pur à 80%) entraînait un fort signal d'interaction, même en absence d'ADN à la surface du biocapteur. Cette interaction artéfactuelle résulte vraisemblablement d'une insertion de molécules à travers la couche lipidique. Ce problème n'ayant jamais été rencontré avec le lot précédent, nous avons voulu comprendre ce nouveau phénomène. Pour ce faire, nous avons étudié le degré d'hydrophobicité de la protéine par chromatographie liquide à haute pression en phase inverse (HPLC ; deuxième dimension du ProteomeLab PF 2D ; Beckman Coulter). Lors de cette expérience, l'échantillon a été injecté sur une colonne de silice non poreuse couplée à des chaînes aliphatiques à 6 carbones. Une fois la protéine en interaction avec la phase stationnaire apolaire, un gradient de solvant organique (acétonitrile) est appliqué dans la colonne. Plus la protéine est hydrophobe, plus le temps de rétention de la protéine est grand. Or, suite à l'injection de notre échantillon, le temps de rétention de la protéine a été de 23 minutes, ce qui correspond à une proportion d'acétonitrile d'environ 80% (Figure 29). Nous pouvons donc conclure que la protéine dont nous disposions présentait un comportement hydrophobe.

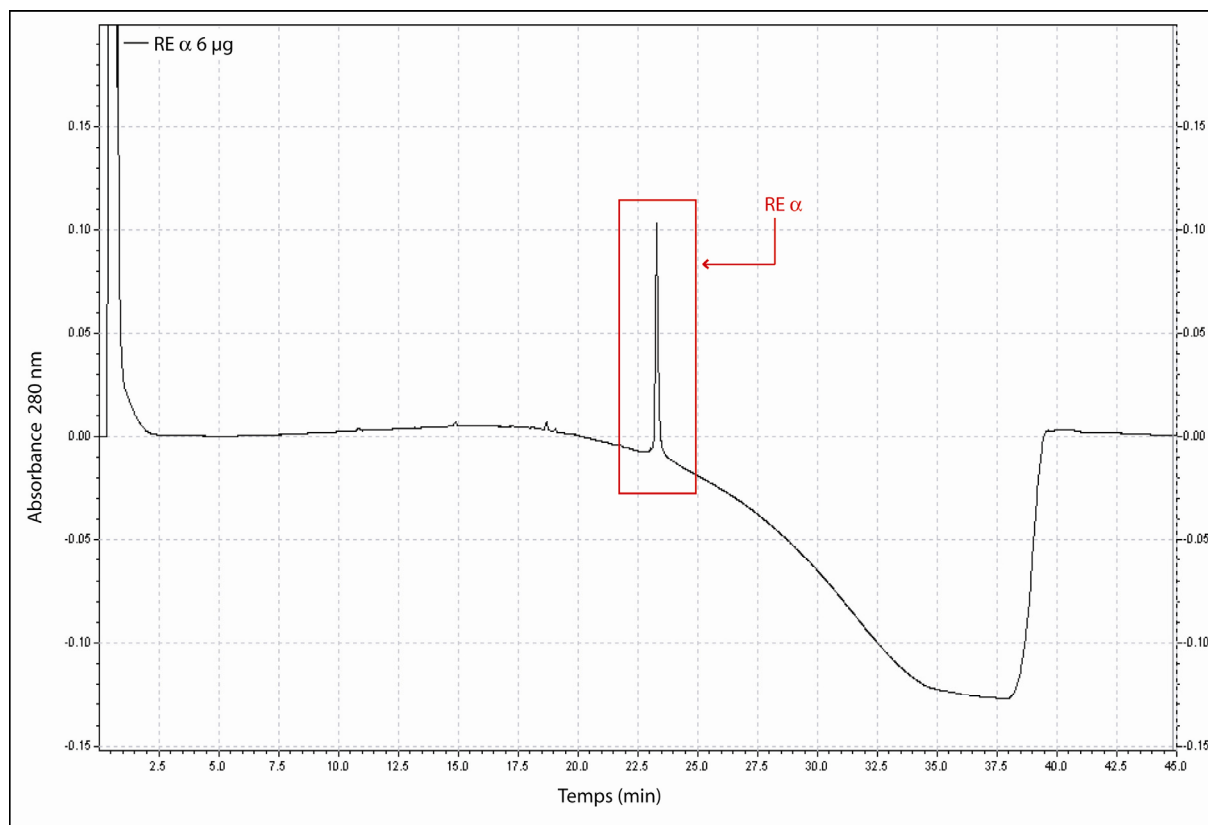


Figure 29 : Analyse du degré d'hydrophobicité du RE α par HPCL. Injection de 6 μ g de RE α dilué dans 300 μ l de PBS. Elution de la protéine à l'aide d'un gradient d'acétonitrile/H₂O.

Afin de lever toute ambiguïté sur la nature de la protéine dont nous disposons, nous avons procédé à une analyse par spectrométrie de masse. Celle-ci a confirmé que la protéine étudiée était bien le RE α humain. Cependant, il s'avère que le RE α est une protéine instable capable de former des agrégats (Pillon, *et al.*, 2005). Ainsi, la détection d'interactions hydrophobes non spécifiques au cours du temps peut être un reflet de l'altération de la protéine recombinante.

De plus, l'utilisation d'un biocapteur destiné à analyser les interactions RE/ERE ne peut être limitée qu'à la seule étude de composés purifiés. En effet, notre volonté est de pouvoir appliquer le modèle à différentes problématiques, comme par exemple, la recherche de perturbateurs endocriniens dans un échantillon complexe (eau de rivière...). Il est donc indispensable de s'affranchir du maximum d'interactions aspécifiques détectables dans un contexte simplifié. Nous avons donc décidé de développer un nouveau concept de biocapteur

basé cette fois sur l'utilisation d'une SAM mixte pour pouvoir limiter les interactions hydrophobes avec la surface.

1.2. Le prototype « C11/C16 »

1.2.1 Assemblage du biocapteur

Après avoir fonctionnalisé la puce d'or par un mélange composé de 90% de HS-C₁₁OH et 10% de HS-C₁₅-COOH, les fonctions carboxyliques ont été activées (EDC/NHS). Les oligonucléotides simples brins D1 et D4, possédant une amine primaire au niveau de leurs extrémités 5', ont été ensuite immobilisés à la surface de la SAM. Les oligonucléotides C3 et C6 complémentaires de D1 et D4 respectivement ont été alors injectés afin de reconstituer les séquences ERE et contrôle. A la fin de cette procédure, l'efficacité d'hybridation de C3 avec D1 a été évaluée à $69,3 \pm 6,9\%$, celle de C6 avec D4 à $78,8 \pm 6,5\%$. La Figure 30 correspond à un exemple de sensorgrammes obtenus lors d'une étape d'assemblage du capteur. En moyenne, la densité de séquence ERE bicaténaire est de 150 ± 30 RU soit $13,6 \pm 2,7$ fmol/mm². La densité de surface de la séquence contrôle double brin est en moyenne de 244 ± 55 RU, soit $22 \pm 4,9$ fmol/mm².

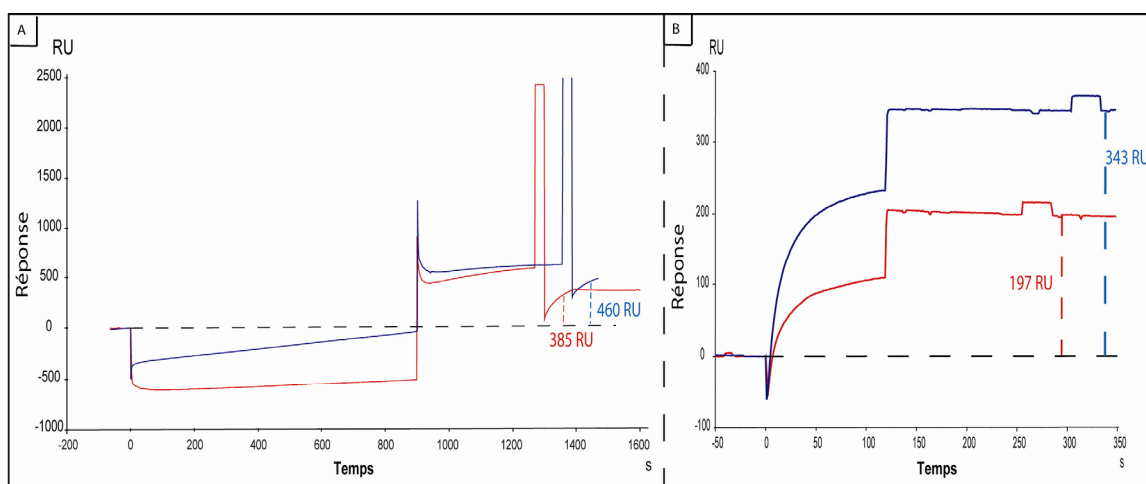


Figure 30 : Assemblage du prototype "C11/C16". (A) Les oligonucléotides pourvus d'une fonction amine primaire en 5' ($10 \mu\text{M}$) D1 (en rouge) et D4 (en bleu) sont immobilisés à la surface du biocapteur *via* les C₁₆ préalablement activés par un mélange EDC/NHS. Les interactions non spécifiques sont ensuite éliminées par un pulse d'OG à 40 mM . **(B)** Hybridation des oligonucléotides ($2,5 \mu\text{M}$) C3 (en rouge) et C6 (en bleu) complémentaires des séquences D1 et D4 respectivement, formant ainsi les séquences bicaténaires ERE et contrôle. Les interactions non spécifiques sont éliminées par un pulse d'OG.

1.2.2 Validation du biocapteur

Dans ce présent rapport la validation d'un modèle correspond à la confirmation que la procédure mise en place est reproductible et en accord avec la littérature.

Une fois assemblée, le biocapteur a été confronté au RE α préalablement incubé avec E₂ pour mettre en évidence les performances de notre biocapteur. L'objectif était de déterminer la spécificité de l'interaction RE/ERE, ainsi qu'une procédure de régénération. A la fin de l'injection du RE α (10 nM) en présence de 10 nM de E₂, le signal d'interaction du récepteur avec l'ERE était en moyenne $3,63 \pm 0,8$ fois supérieur à celui obtenu lors de l'interaction avec la séquence contrôle. Un exemple de cette expérience est illustré Figure 31 A. Ces résultats confirment que l'agencement du prototype « C11/C16 » a permis de réduire considérablement l'interaction non spécifique, résolvant ainsi le problème d'incompatibilité du RE α observé avec le prototype « lipidique ».

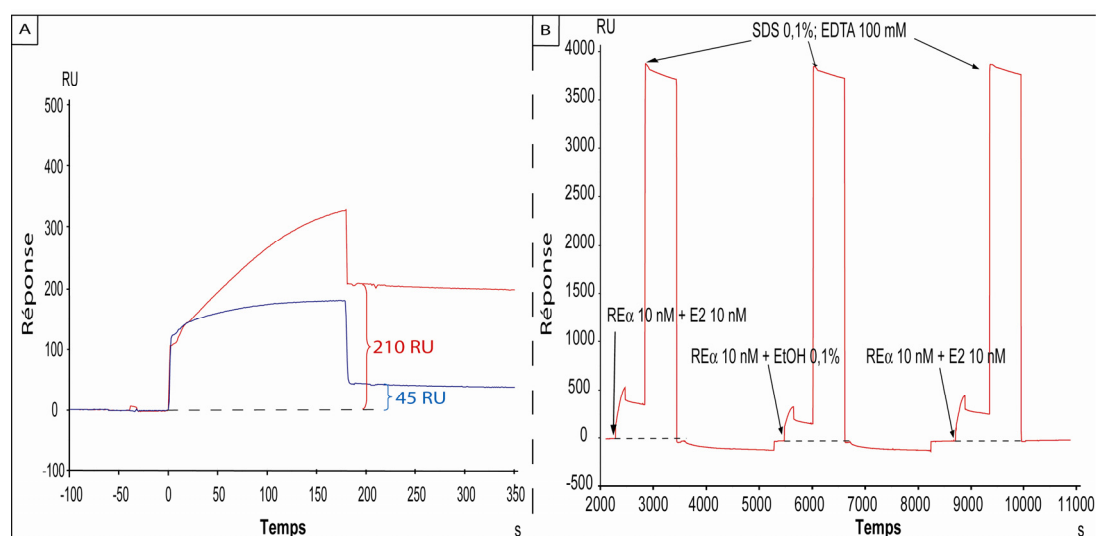


Figure 31 : Validation du capteur ADN/protéine "C11/C16". (A) Le RE α (10 nM) est préalablement incubé 30 minutes avec E₂ (10 nM) à température ambiante. Le mélange est ensuite injecté 3 min à 30 μ l/min sur les pistes présentant l'ERE (en rouge) ou la séquence contrôle (en bleu). (B) Le sensorgramme correspond à une seconde expérience où le capteur est régénéré trois fois par injection de 50 μ l de SDS 0,1% ; EDTA 100 mM à 5 μ l/min. Chaque étape de régénération est suivie d'une nouvelle injection de RE α en présence ou non de E₂

Par ailleurs, afin d'utiliser ce capteur dans une démarche de criblage, il est indispensable de régénérer la surface après chaque injection de RE. Nos expériences ont montré qu'une injection pendant cinq minutes d'une solution dénaturante de SDS 0,1% ;

EDTA 100 mM permettait une régénération totale du biocapteur. A titre d'exemple, la Figure 31 B présente trois injections successives de RE α préalablement incubé avec E₂, de l'éthanol puis à nouveau E₂.

En résumé, notre nouveau biocapteur est régénérable et permet de mettre en évidence l'interaction spécifique du RE α avec l'ERE en présence de E₂. Ces données valident l'utilisation de ce modèle dans une démarche d'identification de composés potentiellement estrogéniques à partir d'une chimiothèque.

1.2.3 Criblage de composés

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'impact d'un ligand sur l'interaction RE/ERE. Pour cela, nous avons incubé 10 nM de RE α avec E₂, avec un antagoniste pur de RE α (ICI 182,780), avec un candidat d'origine naturel (7-O- β -D-glucopyranosylchrysine), ainsi qu'avec les solvants des différents composés testés : (1) l'éthanol (0,1%) et (2) le DMSO (0,1%). Afin de s'affranchir de la réponse non spécifique, nous avons choisi de soustraire la réponse contrôle au signal ERE.

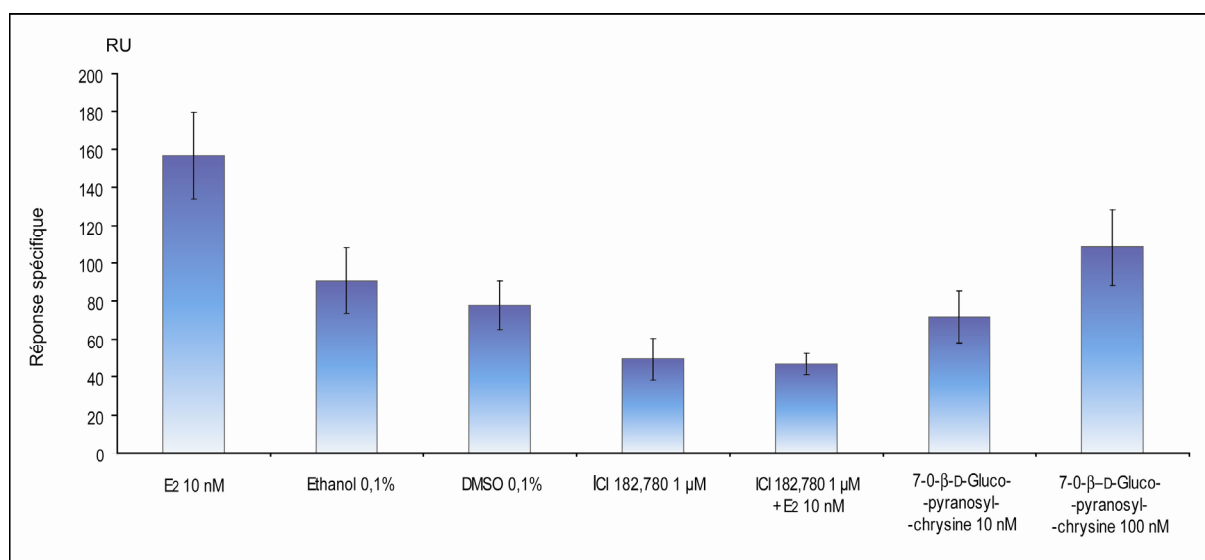


Figure 32 : Modulation de l'interaction RE/ERE en présence de diverses molécules. Le RE α (10 nM) est préalablement incubé 30 minutes à température ambiante avec différentes molécules (E₂ (10 nM), ICI 182,780 (1 µM) seul ou supplémenté de 10 nM de E₂, et de 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine (10 et 100 nM)). L'interaction du RE avec l'ADN a aussi été étudiée en présence d'éthanol ou de DMSO (0,1%). Les histogrammes représentent le signal ERE duquel a été soustrait le signal contrôle.

En présence de E₂, le signal d'interaction du RE α avec l'ERE est de 157 RU, soit 2,33 fmol/mm². En absence de ligand (éthanol ou DMSO), le RE α est capable d'interagir spécifiquement avec l'ADN (91 et 78 RU respectivement). Cependant, le signal d'interaction du récepteur seul est de 1,7 à 2 fois plus faible que celui en présence de E₂. En présence d'ICI 180,780 supplémenté ou non de E₂, la réponse spécifique est inférieure à 50 RU. On peut donc conclure qu'une incubation préalable du RE α avec l'antagoniste empêche la liaison du RE avec l'ADN (Figure 32). La 7-0- β -D-glucoopyranosylchryisine est un flavonoïde glycosylé extrait d'une *Fabaceae* grecque appelée *podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. Ce composé nous a été fourni par l'équipe « Optimisation Métabolique et Cellulaire » (IFR133). Comme cette molécule présente une structure analogue à celle de E₂, nous avons étudié son aptitude à moduler l'interaction de RE α avec l'ERE. L'incubation de ce composé avec le récepteur en proportion équimolaire (10 nM) ne modifie pas la liaison du RE α avec sa cible par rapport au contrôle DMSO. En revanche, en présence d'un excès de 7-0- β -D-glucoopyranosylchryisine (100 nM), la réponse spécifique d'interaction RE/ERE est de 108 \pm 20 RU soit 1,4 fois plus qu'en présence de DMSO seul. Par ailleurs, ce signal représente 68% du signal maximal (obtenu avec E₂).

En conclusion, l'antagoniste ICI 182,780 semble inhiber l'interaction du RE α avec l'ADN, même en présence de E₂. La 7-0- β -D-glucoopyranosylchryisine accroît l'interaction du récepteur avec l'ERE, ce qui nous laisse penser que cette molécule pourrait être un phytoestrogène agoniste. Cependant, l'interaction du RE avec l'ADN est une étape indispensable mais non suffisante à la transactivation d'un gène placé au voisinage d'une séquence cis-régulatrice ERE. En effet, la conformation du RE, influencée par la structure du ligand, affecte son aptitude à recruter des cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs).

Afin de déterminer la nature agoniste ou antagoniste de ce phytoestrogène potentiel, il est nécessaire de l'étudier à l'aide d'un modèle biologique plus complexe possédant

l'intégralité de la machinerie transcriptionnelle. Nous avons donc développé, en parallèle, un modèle cellulaire à partir de la lignée MCF-7 dérivée de cancer du sein et exprimant le RE α .

2. Nouveaux phytoestrogènes : la chryisine et son glucopyranoside

Certaines plantes, comme les *Fabaceae*, produisent des molécules, appelées phytoestrogènes, qui présentent une activité et une structure analogues à E₂. Afin d'identifier de nouvelles molécules susceptibles d'offrir une alternative aux THS classiques, un criblage d'extraits végétaux, issus de cette famille de plantes, a été réalisé sur une lignée de cellules de cancer du sein humain (MCF-7). Celles-ci expriment le RE de type α (de Cremoux, *et al.*, 2003) et prolifèrent en présence d'estrogènes (Lazennec, *et al.*, 1999).

Nous avons observé que l'extrait de *podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (10 $\mu\text{g/ml}$) induit une prolifération identique à celle obtenue en présence de 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de E₂. Afin d'identifier la molécule responsable de cet effet nous avons purifié les différentes molécules présentes dans cet extrait puis testé leur aptitude à transactiver un gène rapporteur (la luciférase) *via* le RE α . Pour cela, nous avons mis au point un modèle cellulaire MCF-7 transfecté transitoirement par un vecteur rapporteur 2ERE-pS2-Luc contenant le gène de la luciférase sous la dépendance du promoteur faible du gène *pS2*, en aval de deux ERE. Nous avons observé lors de ce travail que la 8-C- β -D-glucopyranosylgénistéine ne possédait aucune activité transactivatrice, contrairement à sa forme aglycone (génistéine).

En revanche, nous avons montré que la 7-O- β -D-glucopyranosylchryisine, composé majoritaire de l'extrait végétal, ainsi que sa forme aglycone, la chryisine, étaient capables d'activer l'expression d'un gène estrogénodépendant *via* le RE α .

La transactivation du gène rapporteur par RE α en présence de 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin confirme l'interaction RE/ERE détectée à l'aide de notre biocapteur. Le modèle cellulaire précise le caractère agoniste de cette molécule.

Ces résultats sont présentés dans la publication numéro II.

Effect of 7-O- β -D-Glucopyranosylchrysin and its Aglycone Chrysin Isolated from *Podocytisus caramanicus* on Estrogen Receptor α Transcriptional Activity.

Alexandre Berthier, Corinne Girard, Aurélie Grandvullemin, Frédéric Muyard, Alexios-Leandros Skaltsounis, Michèle Jouvenot et Régis Delage-Mourroux.

Planta Medica

2007 ; vol 73 (14) : 1447-1551

Alexandre Berthier¹
Corinne Girard²
Aurélie Grandvullemin²
Frédéric Muyard²
Alexios-Leandros Skaltsounis³
Michèle Jouvenot¹
Régis Delage-Mourroux¹

Effect of 7-O- β -D-Gluco-pyranosylchrysin and its Aglycone Chrysin Isolated from *Podocytisus caramanicus* on Estrogen Receptor α Transcriptional Activity

Abstract

A screening of Greek Fabaceae extracts identified the methanolic extract of *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. as having proliferative activity on human breast cancer cells (MCF-7). Using transient transfection experiments, we have first used three compounds described for their estrogen-like properties, E₂, genistein (Gen) and biochanin A (Bch), as controls to evaluate our cellular model. Secondly, we have demonstrated that the 7-O- β -D-gluco-pyranosylchrysin (Glc-*chr*), the most abundant flavone of the extract, and its aglycone chrysin were able to increase estrogen receptor α transcriptional activity in MCF-7 cells. We have also shown that the estrogenic activity of Glc-*chr* could be completely suppressed by the pure estrogen antagonist ICI 182,780 suggesting that the effect of Glc-*chr* is mediated by ER α .

Key words

Podocytisus caramanicus Boiss. & Heldr. · Fabaceae · 7-O- β -D-gluco-pyranosylchrysin · chrysin · estrogen receptor α

Abbreviations

CSFCS: charcoal-stripped fetal calf serum

E₂: estradiol

ER: estrogen receptor

ERE: estrogen response element

FCS: fetal calf serum

FM: full medium

Introduction

Estrogens are hormones of critical importance involved in the development, growth, and maintenance of reproductive tissues [1]. Estrogen effects are mediated by the estrogen receptors (ER), members of the nuclear receptor superfamily [2]. These receptors upon binding specific ligands modulate the expression of

estrogen-responsive genes after interaction with palindromic DNA sequences called estrogen response elements (ERE) [3]. A decrease in estrogen production is a naturally occurring process in aging women resulting in the so called "menopause". This hormonal disturbance generates different physiological dysfunctions and may also be linked to several diseases [4], [5]. Hormone replacement therapy using synthetic or natural hormones reduc-

Affiliation

¹ EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, Besançon, France

² Laboratoire de Pharmacognosie, EA 3921 "Optimisation Métabolique et Cellulaire", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Besançon, France

³ Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece

Correspondence

Prof. Régis Delage-Mourroux · EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central" · IFR 133 · Université de Franche-Comté · UFR Sciences et Techniques · 16, route de Gray · 25030 Besançon cedex · France · Phone: +33-38-166-6544 · Fax: +33-38-166-6267 · E-mail: regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr

Received March 12, 2007 · Revised August 29, 2007 · Accepted September 21, 2007

Bibliography

Planta Med 2007; 73: 1447–1451 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2007-990248 · Published online October 19, 2007
ISSN 0032-0943

es the incidence of these dysfunctions and pathologies but is also associated with a growing risk of developing breast or endometrial cancer [6]. Plant-derived molecules with estrogen-like activity, named phytoestrogens, mimic the estrogen-like chemical structure and may play a protective role against cancer. Fabaceae constitute a plant family well known to produce this type of molecule, in particular isoflavones. In order to identify new natural chemicals showing estrogen-like activity, screening studies of plant extracts from this family were performed. Extracts were tested on MCF-7 cells which express ER α [7], and depend on estrogen stimulated ER α activity for growth [8]. We have observed that the methanolic extract of *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. exhibits a proliferative effect similar to that obtained with estradiol (E₂). The induction of proliferation (1.6-fold) was similar either in the presence of 0.020 $\mu\text{g}/\text{mL}$ E₂ or in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ extract. These results led us to further investigate the identification of active estrogen-like compounds from this plant.

Materials and Methods

Materials

Genistein, 8-C-glucopyranosylgenistein and biochanin A were previously isolated from Greek Fabaceae species. The purity of isolated compounds was more than 98%.

General procedures

Analytical TLC and column chromatography were carried out using silica gel [Merck; 0.063–0.200 mm; Darmstadt, Germany]. Centrifugal partition chromatography was performed using a CPC Kromaton[®] 230 mL apparatus (Angers, France). UV spectra were recorded in MeOH using a Shimadzu UV 160A spectrometer and IR spectra in KBr on a Shimadzu FTIR-8201PC IR spectrometer. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were obtained in CDCl₃ or CD₃OD using a Bruker Avance 300 (300 MHz and 75 MHz, respectively) NMR spectrometer (Wissembourg, France). ¹H-¹H COSY and COSY-LR and ¹³C-¹H HMQC and HMBC experiments were performed using standard Bruker microprograms.

Plant material

Aerial parts of *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. were collected from the Ioannina area (Tymphi mount, Greece) in June 2001 and a voucher sample of the whole plant has been authenticated by Eleftherios Kalpoutzakis and deposited at the Ioannina Herbarium, Greece, under the accession number In022.

Extraction and isolation

The dried and pulverized plant (535 g) was de-fatted by extraction with hexane and then extracted three times at room temperature with 2 L of CH₂Cl₂ each time, and five times with 2 L of MeOH each time for 2 days. The MeOH extract (43 g) was found to stimulate the MCF-7 cells proliferation and was collected for further analysis. The crude extract was first dissolved in MeOH-AcOEt (50:50 then 70:30) and from the solution 3.07 g of Glc-*chr* were precipitated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was subjected to a liquid/liquid extraction with CHCl₃-MeOH-H₂O (4:3:2). The upper phase was collected, concentrated (32 g of residue) and further fractionated on silica gel column chromatography (5.7×50 cm, Merck;

0.063–0.200 mm) using a CH₂Cl₂-MeOH gradient. 278 fractions were obtained and monitored by thin layer chromatography (TLC). Those showing comparable mixtures were pooled. Polar fractions collected between [90] and [278] gave identical precipitates that were filtered, grouped and identified as Glc-*chr* (3.06 g). Other interesting grouped fractions were further purified.

Fractions [18–36] (43.7 mg), [37–72] (37.3 mg) and [73–89] (63.5 mg) were purified by preparative TLC, eluting with CH₂Cl₂-MeOH (95:5), to give respectively *Chr* (1.6 mg), daidzein (1.5 mg) and isoprunitin (4.1 mg).

Fraction [90–121] (322 mg) was passed through a Sephadex LH-20 column (1.0×10 cm) packed in methanol to give 71 fractions: fraction [49–55] (7.6mg) was chromatographed on preparative TLC eluting with CHCl₃-MeOH (90:10), resulting in the isolation of luteolin (4.4 mg) and fraction [27–33] was eluted through a chromatography column (1.2×12 cm, Merck; 0.063–0.200 mm) using a CH₂Cl₂-acetone gradient. Amongst the 102 collected fractions, [20–25] (2.7 mg) corresponded to isoprunitin while [49–20] was purified by preparative TLC (CH₂Cl₂-acetone-HOOH; 90:10:8) to afford to Glc-*chr* (1.8 mg).

Fraction [155–156] (525mg) was fractionated by CPC with lower and upper layers of the solvent system CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (7:13:8) as mobile and stationary phases, respectively, using 5 mL min⁻¹ flow rate, 1200 rpm rotation speed and 25 bar pressure. 185 fractions were eluted. Fractions [82] to [130] gave precipitates that were collected and identified as Glc-*gen* (41.5 mg), whereas fractions group [5–53] (85.3mg) was passed through Sephadex LH-20 column (1.0×8 cm) in MeOH. 56 fractions were collected. Fraction [37–43] gave, after purification by preparative TLC (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O; 30:70:10), 1.1 mg of ononin.

Fraction [167–177] (653 mg) was passed through Sephadex LH-20 column (1.8×15 cm) in MeOH to give 83 fractions. Fraction [55–79] (9.9 mg) was subjected to preparative TLC and resulted in 1 mg of luteolin.

All structures were elucidated according to standard NMR methods and literature data [9] or by direct comparison with original samples.

Cell transfection and stimulation

MCF-7 cells (Centre Hospitalier de Lyon Sud, France) were maintained in phenol red-free DMEM tissue culture medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fungizone (0.23 U/mL) (Invitrogen; Cergy Pontoise, France), ciprofloxacin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Euromedex; Souffelweyersheim, France) and plasmocin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Cayla-In-vivoGen Europe; Toulouse, France) [FM] at 37 °C in 5% CO₂ and humidified atmosphere. Cells were co-transfected with a reporter vector 2ERE-pS2-Luc and a pSV- β -galactosidase control vector (β -gal). The 2ERE-pS2-Luc vector was used to monitor transactivation of ER-dependent estrogen-like activity and the β -gal vector was used as an internal control for transfection efficiency. Cells were maintained for 48 h in FM medium with 5% of charcoal-stripped fetal calf serum (CSFCS), seeded in 24-well plates (of 1×10⁶ cells/well) and incubated for 24 h at 37 °C. Cells were transfected with 1 μg of TransFast reagent (Promega; Charbon-

nières-les-Bains, France), 1 μg of 2ERE-pS2-Luc and 0.75 μg of β -gal. After 2 h incubation, 800 μL of stimulating medium (FM with only 0.5% of CSFCS) were added to each well. Cells were then stimulated with 1 μL of 17 β -estradiol (E_2) (Sigma; Lyon, France), purified molecules or control vehicles in each well to obtain 0.1% of vehicle final concentration (all components used in this study are shown in Table 1). After 48 h stimulation, cells were lysed with Reporter lysis buffer (Promega). Luciferase assays were performed using 20 μL cell extracts and 75 μL of Luciferase assay system (Promega). Light emission was detected using a luminometer system (VICTOR2 Wallac; Perkin Elmer; Courtaboeuf, France). β -Galactosidase assays were performed in 96 well plates using 30 μL cell extracts and 70 μL of 2.92 μM *ortho*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (Sigma; Lyon, France) in sodium phosphate buffer pH 7.5 (1 mM MgCl_2 , 45 mM β -mercaptoethanol). Plates were incubated 40 minutes at 37 $^\circ\text{C}$, and the reaction was stopped with 150 μL of 1 M Na_2CO_3 . Produced *ortho*-nitro-phenol was quantified by spectrophotometry at 405 nm.

Statistical analysis

Luciferase activities results were the means from three separate experiments run in duplicate for each treatment. Means were compared to 1 nM E_2 effect; significant differences were determined using Student's t test ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Podocytisus caramanicus is a perennial, not climbing shrub, distributed in Greece, Albania, former Yugoslavia and Turkey [10]. Investigations on this extract, using subsequent fractionation methods, identified the 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin (Glc-chr) as the major component (about 15% of the methanolic extract). Other previously described flavonoids [chrysin (Chr), luteolin, daidzein, isoprunitin, 7-O- β -D-glucopyranosylisoprunitin, genistin and ononin] were also present at lower levels. MCF-7 cells were chosen to investigate the potential ER-driven transcriptional effect of these plant molecules because of their ability to respond to E_2 treatment. To characterize the ER transcriptional activity, cells were transfected with plasmid containing a luciferase reporter gene under the control of two estrogen response elements (ERE).

In order to validate our cellular model, E_2 as a natural ligand and two compounds described for their estrogen-like properties, genistein (Gen) and biochanin A (Bch), (Table 1) were used as controls to evaluate ER α transcriptional activity. As shown in Fig. 1, ER transactivation in the presence of E_2 (1 nM) was increased four-fold if compared to the control level. When cells were treated with Gen (1 μM) or Bch (1 μM), luciferase activity was respectively six- and ten-fold higher than the control. Thus,

		R₁	R₂	R₃	R₄
Glc-chr	7-O- β -D-Glu-chrysin	β -Glu	OH	H	H
Chr	chrysin	OH	OH	H	H
		R₁	R₂	R₃	R₄
Gen	genistein	OH	OH	OH	H
Bch	biochanin A	OH	OH	OCH ₃	H
Glc-gen	8-C- β -D-Glu-genistein	OH	OH	OH	β -Glu
E₂	Estradiol				

Table 1 Structures of tested compounds

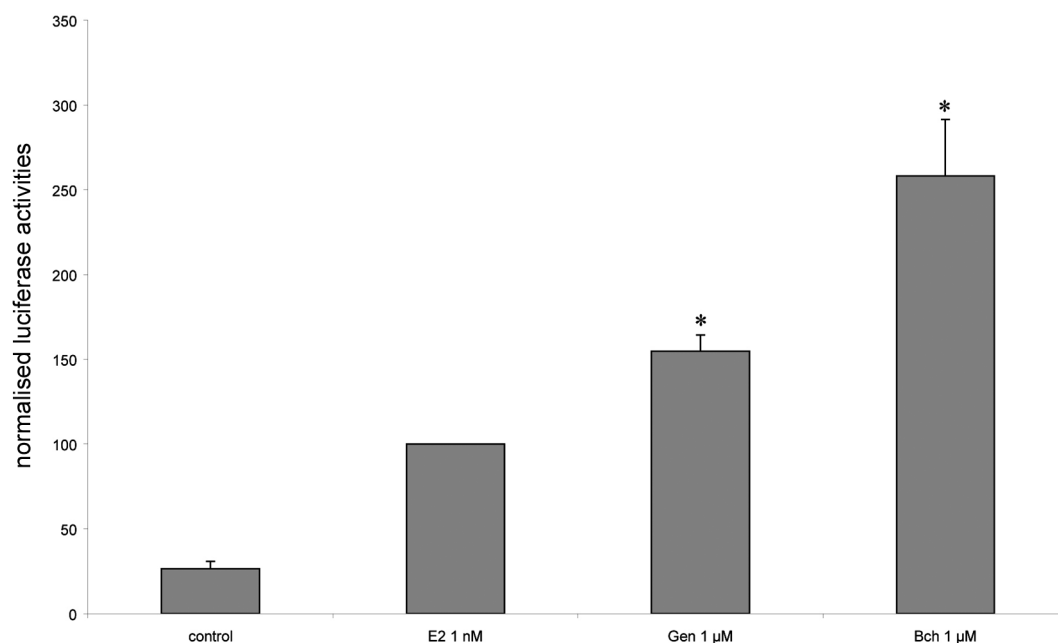


Fig. 1 Cellular model validation. Activities are compared with 1 nM E₂ stimulation (100%). MCF-7 cells were stimulated with 0.1% of vehicle (ethanol) as control. All data were normalised by β-galactosidase activity. Cells were stimulated with a physiological quantity of the natural ligand 1 nM E₂ or with the recommended quantity of well-known phytoestrogens 1 μM of Gen or 1 μM of Bch. Values were the means from three separate experiments with duplicate wells for each stimulation. * p < 0.05 as compared with the effect of 1 nM E₂.

we can conclude that transiently transfected MCF-7 cells constitute a valid cell model for studying estrogenic activity.

Glc-chr, Chr and 8-C-glucopyranosylgenistein (Glc-gen) effects on MCF-7 were evaluated, alone, or in combination with 1 nM E₂. We found that Glc-chr and its aglycone Chr, at 1 μM concen-

tration, increased luciferase activity of the transfected ERE reporter plasmid whereas Glc-gen did not show activity (Fig. 2). Furthermore, no additive or synergistic effect was observed when the different compounds were incubated in the presence of E₂. Furthermore, natural flavonoids increase estrogen transcriptional activity when they are in the aglycone form. In our study, inter-

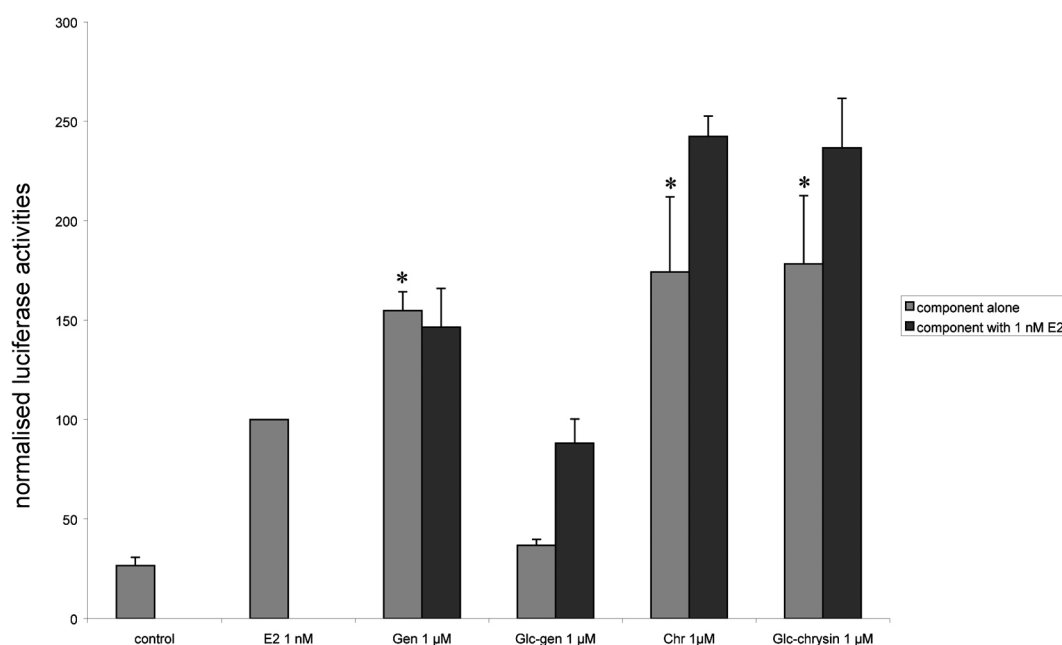


Fig. 2 7-O-β-D-Glucopyranosylchrysin increases estrogenic activity. Activities are compared with 1 nM E₂ stimulation (100%). MCF-7 cells were stimulated with 0.1% of vehicle (ethanol or DMSO) as controls. Cells were stimulated with 1 nM E₂ or 1 μM Gen, Glc-gen, Chr and Glc-chr alone or in addition to 1 nM E₂. Values were the means from three separate experiments with duplicate wells for each stimulation. * p < 0.05 as compared with the effect of 1 nM E₂.

estingly, we showed, for the first time, that the glycosylated flavonoid Glc-*chr* as well as its aglycone form are able to increase ER transcriptional activity. It is intriguing to observe that glycoside residues are generally too hydrophilic to cross the lipid barrier and in order to activate ERE-driven genes, glycosylated derivatives would need to diffuse through the plasma membrane. Therefore we suggest here that Glc-*chr* might be metabolised by an extracellular enzyme before diffusing through the cell membrane. Yuan et al. [11] showed that tumoral cells express at their surface a β -glucuronidase that converts 7-*O*- β -glucuronylgenistein to genistein, explaining the antiproliferative effect of 7-*O*- β -glucuronylgenistein on tumoral cells. So, we could presume that MCF-7 cells express β -glucosidase activity on the membrane. This enzyme may cleave the *O*-glycosylated but not the *C*-glycosylated bond. This hypothesis might explain the differences observed on ER transactivation using Glc-*chr* and Glc-*gen* (Fig. 2).

More importantly, the estrogenic activity of Glc-*chr* was completely suppressed by 1 μ M pure estrogen antagonist ICI 182,780 (Fig. 3) suggesting that the Glc-*chr* effect is mediated by ER α .

In conclusion, we describe here for the first time, the ability of the widely distributed flavone chrysin and its glucosylated derivative Glc-*chr*, isolated from *Podocytisus caramanicus*, to increase estrogen receptor α transcriptional activity in MCF-7 cells. Our results suggest that phytochemical studies of plants remain a promising first step towards the identification of new estrogenic ligands to find alternative estrogenic compounds to estradiol.

Acknowledgements

This research work was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). We thank Dr. Saez (Centre Hospitalier de Lyon Sud, France) for

generously providing the MCF-7 cell line and Dr. Katzenellenbogen (University of Illinois, Urbana, USA) for the 2ERE-pS2-Luc reporter plasmid. We are grateful to AstraZeneca (Reims, France) for providing antiestrogen ICI 182,780. We thank Dr. Paolo Martini for reviewing the English.

References

- ¹ Diel P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 2002; 127: 217–24.
- ² Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835–9.
- ³ Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2905–19.
- ⁴ Mc Ewen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20: 279–307.
- ⁵ Dhandapani KM, Brann DW. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod* 2002; 67: 1379–85.
- ⁶ Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 2002; 288: 321–33.
- ⁷ De Cremoux P, Tran-Perennou C, Brockdorff BL, Boudou E, Brunner N, Magdelenat H et al. Validation of real time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 409–18.
- ⁸ Lazennec G, Alcorn JL, Katzenellenbogen BS. Adenovirus-mediated delivery of a dominant negative estrogen receptor gene abrogates estrogen-stimulated gene expression and breast cancer cell proliferation. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 969–80.
- ⁹ De Rosa S, De Stefano S. Chrysin 7-gentiobioside from the flowers of *Spartium junceum*. *Phytochemistry* 1983; 22: 2323–4.
- ¹⁰ Tutin TG. *Flora Europea*; 2nd edition Cambridge: Cambridge University Press; 1968
- ¹¹ Yuan L, Wagatsuma C, Yoshida M, Miura T, Mukoda T, Fujii H et al. Inhibition of human breast cancer growth by GCPTM (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by β -glucuronidase from tumor tissues. *Mutat Res* 2003; 523–524: 55–62.

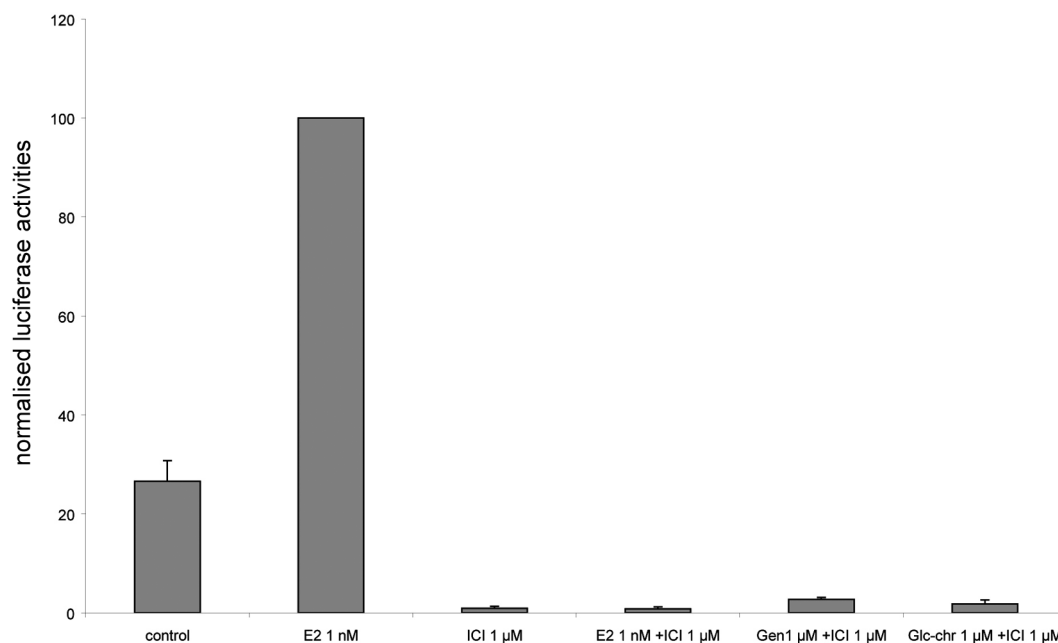


Fig. 3 7-*O*- β -D-Glucopyranosylchrysin's estrogenic activity is dependent on ER α . Activities are compared with 1 nM E₂ stimulation (100%). Cells were treated with 1 μ M ICI 182,780 (AstraZeneca; Reims, France) to confirm the essential role of ER α in this reporter expression modulation.

3. Biocapteur protéines/protéines : identification de partenaires de la protéine GEC1

3.1. Généralités et objectifs

L'équipe « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central » a identifié un gène précocement régulé par E₂ : *gec1* (Pellerin, *et al.*, 1993). Ce gène code une protéine de 117 aminoacides qui semble être impliquée dans des phénomènes de transport de protéines au sein de la cellule comme par exemple le transport du récepteur GABA_A (gamma aminobutyric acid) *via* une interaction avec sa sous unité $\gamma 2$ et avec la tubuline (Mansuy, *et al.*, 2004). Cependant, le rôle biologique de cette protéine reste encore à élucider. Pour ce faire, une des approches du laboratoire est l'identification des partenaires protéiques de GEC1. Le prototype « C11/C16 » que nous avons développé lors de nos travaux, s'est avéré approprié à l'étude des interactions ADN/protéines mais aussi à celle des interactions protéines/protéines. Nous avons donc adapté notre biocapteur à la recherche de partenaires protéiques de GEC1.

3.2. Biocapteur protéines/protéines

3.2.1 Production et purification pSBET-FLAG-GEC1-(His)₆

La protéine GEC1 présentant une forte identité avec GABARAP, il n'existe pas d'anticorps capables de discriminer ces deux protéines. Aussi, afin de réaliser différentes expériences (détection, localisation, purification...), nous avons cloné la partie codante de l'ADNc de *gec1* flanquée de deux séquences spécifiques codant respectivement les étiquettes FLAG et hexa-histidine (Figure 33 A) dans un vecteur pSBET. Après expression de cette protéine recombinante dans des bactéries BL21 DE3, nous l'avons purifiée par chromatographie d'affinité au nickel, puis visualisée par SDS-PAGE (Figure 33 B).

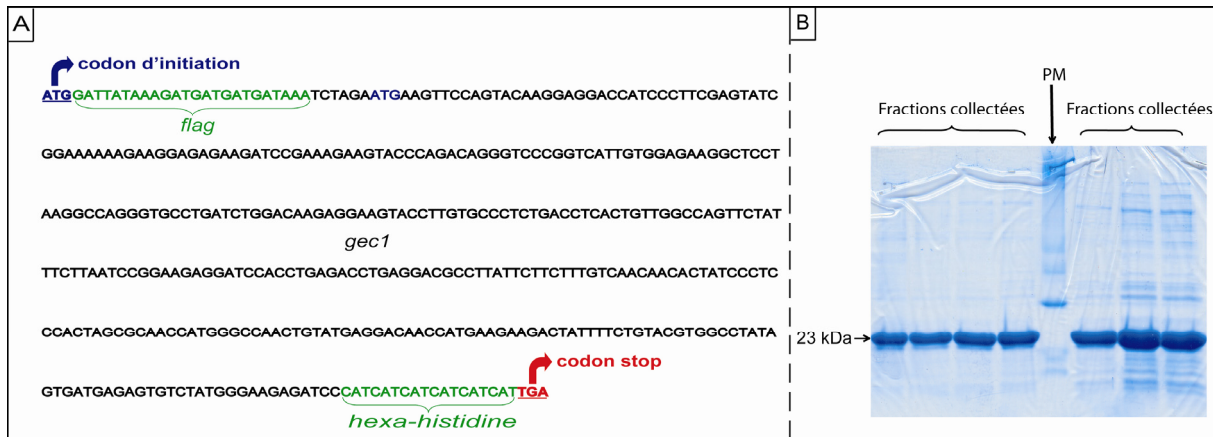


Figure 33 : La protéine recombinante FLAG-GEC1(His)₆. (A) Séquence codant la protéine recombinante (ATG : codon d'initiation de la transcription ; TGA : codon stop). (B) Evaluation du degré de pureté de la protéine par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (PM : marqueur de masse moléculaire).

3.2.2 Assemblage du biocapteur

Après fonctionnalisation de la surface d'or à l'aide d'une SAM composé de 97% de HS-C₁₁OH et 3% de HS-C₁₅-COOH, les fonctions carboxyliques ont été activées par un mélange EDC/NHS. Cette étape permet le couplage covalent de l'anticorps *via* une amine primaire présentée soit par la partie NH₂ terminale de la protéine, soit par un résidu lysine, asparagine, glutamine ou arginine au niveau du fragment Fc de l'immunoglobuline. La densité d'anticorps anti-FLAG immobilisés à la surface du biocapteur était de $12,4 \pm 1,4$ fmol/mm² (1857 ± 203 RU) (Figure 34 A). La protéine FLAG-GEC1-(His)₆ a ensuite été capturée à la surface du biocapteur *via* une reconnaissance antigène/anticorps. A la fin de l'étape d'association, le signal de la protéine recombinante était de 120 RU soit environ 8 fmol/mm², ce qui représente une reconnaissance de 64,5% des cibles anticorps dans le cadre d'un rapport stoechiométrique antigène/anticorps de 1 pour 1. Dès l'arrêt de l'injection, nous avons pu observer une étape de dissociation ce qui confirme que la fixation de la protéine recombinante suit bien une reconnaissance antigène/anticorps (Figure 34 B).

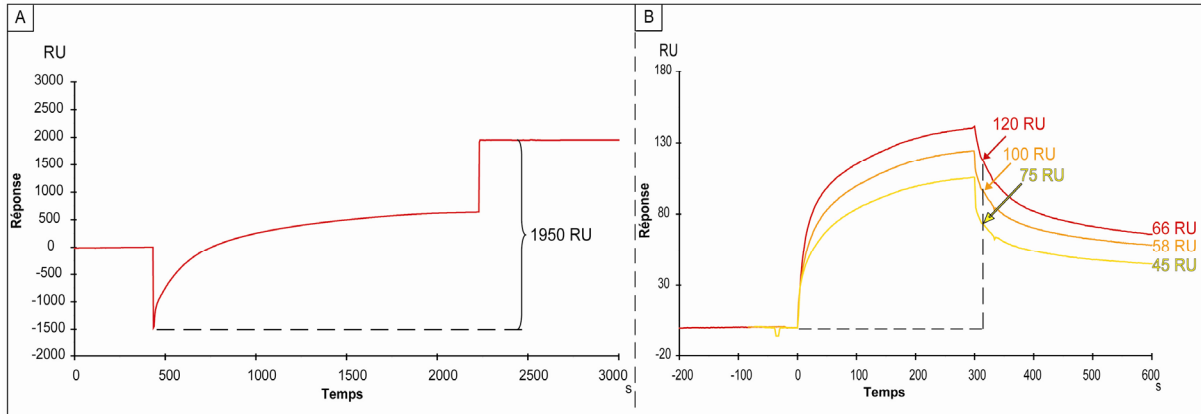


Figure 34 : Assemblage du biocapteur protéines/protéines. (A) Immobilisation de l'anticorps anti-FLAG (30 µg/ml). **(B)** Injections successives de FLAG-GEC1-(His)₆ à 10 µM (rouge : première injection ; orange deuxième injection ; jaune troisième).

3.2.3 Validation du biocapteur

Afin de valider l'utilisation de ce modèle de biocapteur, nous avons souhaité étudier le comportement d'un partenaire connu de GEC1. Nous avons mis en évidence l'interaction de la tubuline purifiée avec la protéine FLAG-GEC1-(His)₆. Afin de confirmer que cette interaction était bien spécifique, nous avons suivi l'évolution du niveau de réponse après plusieurs injections successives de tubuline. Il en ressort que ces injections entraînent des niveaux de réponse décroissants aboutissant à un signal d'interaction quasi nul dès la quatrième injection. Une nouvelle injection de FLAG-GEC1-(His)₆ permet de fixer à nouveau de la tubuline (Figure 35 A). L'augmentation du signal suite à une injection de tubuline reflète bien une interaction spécifique de cette protéine avec GEC1.

Par ailleurs, une régénération du capteur au niveau de l'anticorps est possible par compétition avec du peptide FLAG, qui permet la dissociation de la protéine d'intérêt même après interaction avec un partenaire. Cette régénération est optimale avec une concentration en peptide FLAG de 1 mM (Figure 35 B). Ces données permettent de valider l'utilisation de ce biocapteur dédié à l'étude des interactions des partenaires protéiques de GEC1.

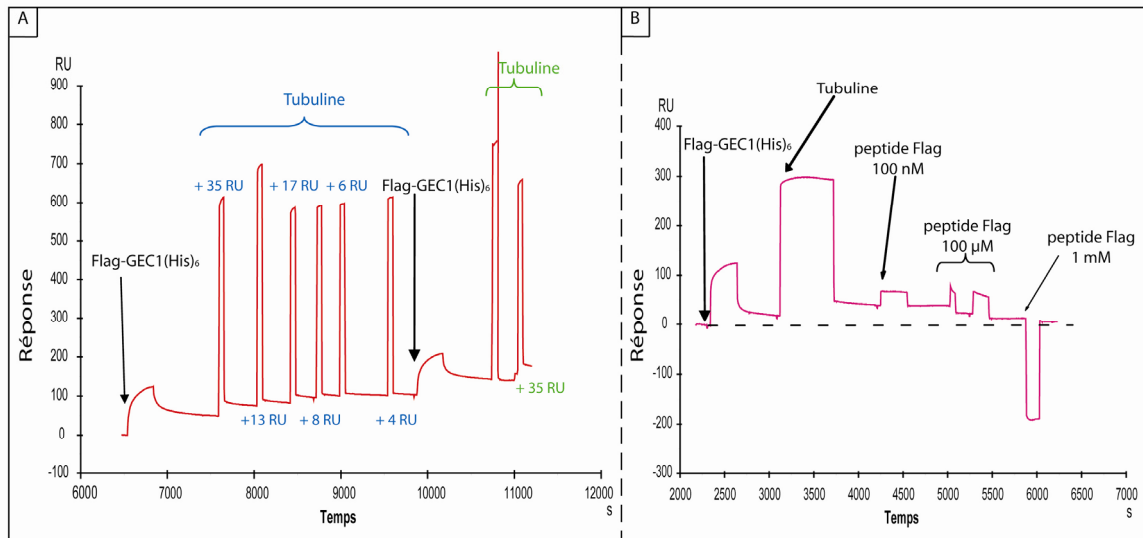


Figure 35 : Validation et régénération du biocapteur. (A) Immobilisation de FLAG-GEC1-(His)₆ à 10 μM, suivie de 6 injections successives de tubuline (1 μM ; en bleu). Rechargement en FLAG-GEC1-(His)₆ puis injection de tubuline (en vert). **(B)** Immobilisation de FLAG-GEC1-(His)₆ à 10 μM, suivie d’une injection de tubuline (1 μM) et de concentrations croissantes de peptide FLAG (100 nM à 1 mM).

3.2.4 Etude des interactions

En 2002, une étude par GST pull-down a montré que GABARAP était capable de former des homodimères (Nymann-Andersen, *et al.*, 2002). Compte tenu de la grande identité structurale de cette protéine avec GEC1, nous avons souhaité déterminer si GEC1 était aussi capable de former des homodimères. Pour cela, nous avons utilisé la protéine de fusion GST-GEC1 dépourvue de peptide FLAG, donc ne pouvant être capturée à la surface du biocapteur. Après fixation de FLAG-GEC1-(His)₆, nous avons injecté 1 μM de GST-GEC1 pendant 5 minutes à 20 μl/min. A la fin de l’injection, le signal d’interaction de la protéine de fusion avec le biocapteur était de 80 RU soit 2,3 fmol/mm² (Figure 36). On peut donc affirmer que 50 % des cibles FLAG-GEC1-(His)₆ ont été reconnues.

Par ailleurs, afin de vérifier la spécificité de cette interaction, nous avons ensuite injecté la protéine purifiée GST sur une piste présentant une surface équivalente. A la fin de l’injection aucune interaction n’est détectée (Figure 36), ce qui nous permet de conclure que GEC1 est capable de former spécifiquement des homodimères *in vitro*.

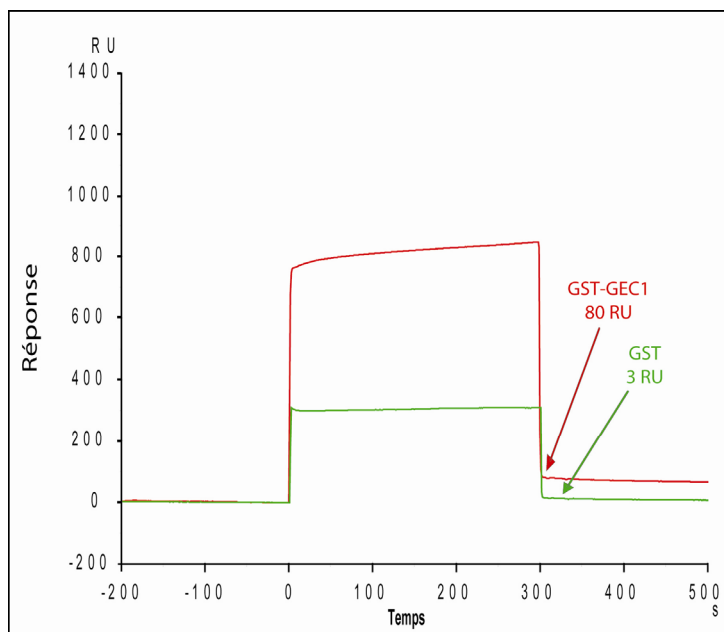


Figure 36 : Mise en évidence de l'homodimérisation spécifique de GEC1 par SPR. Après immobilisation de la protéine FLAG-GEC1-(His)₆ (70 RU soit 4,6 fmol/mm²), les protéines GST (en vert) et GST-GEC1 (en rouge) ont été confrontées au biocapteur.

3.3. Confirmation des résultats SPR par GST pull-down

Afin de confirmer cette homodimérisation, nous avons réalisé des expériences de GST pull-down.

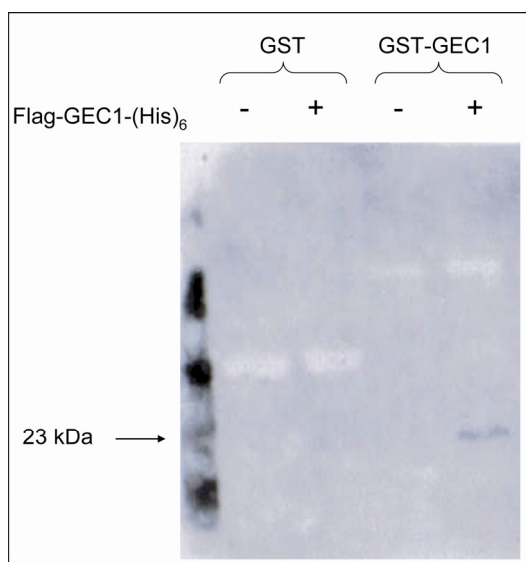


Figure 37 : Confirmation de l'homodimérisation spécifique de GEC1 par GST pull-down. La protéine FLAG-GEC1-(His)₆ a été incubée la nuit avec des billes de sépharose couplées à du glutathion sur lesquelles ont été immobilisées les protéines GST et GST-GEC1. La protéine FLAG-GEC1-(His)₆ a ensuite été détectée par Western Blotting à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette hexa-histidine.

Les résultats présentés Figure 37 démontrent que GEC1 est capable de former des homodimères spécifique *in vitro*, ce qui confirme les résultats obtenus par SPR.

DISCUSSION - CONCLUSIONS

Ce projet repose sur la collaboration de deux équipes de recherche l'équipe E₂SNC (IFR 133 IBCT) et la plateforme protéomique CLIPP (département MN2S ; Institut FEMTO-ST et IFR 100 (Dijon)). Ces deux entités sont issues de deux domaines différents : (1) l'étude de la régulation génique *via* les estrogènes et (2) les nano/microtechnologies appliquées à la protéomique. Lors de ce partenariat, nous avons pu mettre au point deux prototypes de biocapteurs SPR destinés principalement à l'étude des interactions ADN/protéine et en particulier, l'interaction du RE α avec sa cible ERE.

Nous avons montré, par une double approche, que la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysine favorisait l'interaction RE α /ERE *in vitro* (par SPR) et permettait la transactivation d'un gène estrogénodépendant *via* le RE α (par transfection cellulaire).

Par ailleurs, ayant développé un biocapteur compatible avec l'étude des interactions protéines/protéines (prototype « C11/C16 »), nous avons adapté notre modèle à la recherche des partenaires de la protéine GEC1, afin de mieux comprendre son rôle biologiques.

1. Développement des biocapteurs RE/ERE

Lors de ces travaux, nous avons développé un biocapteur SPR (**prototype « lipidique »**) reposant sur une architecture hautement maîtrisée : contrôle de la densité de surface des cibles nucléotidiques et de l'éloignement des séquences ADN par rapport à la surface de la biopuce. Pour cela, nous avons apporté quelques évolutions à un modèle de biocapteur développé initialement : modulation de la proportion de DOGS et utilisation de deux points d'ancrage pour immobiliser l'ADN. Ces modifications permettent de mieux maîtriser le positionnement de la séquence nucléotidique dans un environnement biomimétique. En effet, ce concept reposait sur la présentation *via* une protéine redox d'une séquence nucléotidique double brin à la surface d'une monocouche phospholipidique (Boireau, *et al.*, 2002, Boireau, *et al.*, 2005b). Nous avons donc initié nos travaux à partir de

cette approche originale. Ce concept n'ayant pas été développé initialement pour l'étude des interactions ADN/protéine, nous avons caractérisé chaque étape d'assemblage de ce biocapteur à l'aide de tous les savoir-faire communs dont nous disposions, aussi bien dans le domaine de la Biochimie que dans celui des Nanosciences. Dans un deuxième temps, nous avons conçu un **prototype** « C11/C16 » compatible avec l'étude des interactions ADN/protéine, mais aussi protéines/protéines.

1.1. Maîtrise de l'architecture

L'élaboration du **prototype** « lipidique » nous a permis de présenter une séquence nucléotidique de manière hautement contrôlée au niveau de la densité de surface, de l'accessibilité de celle-ci pour le RE α , ainsi qu'au niveau des contraintes exercées sur l'ADN. Les biocapteurs RE/ERE développés par d'autres équipes de recherche reposent sur l'immobilisation d'oligonucléotides biotinylés sur des surfaces de natures variées présentant une forte densité de streptavidine (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Asano, *et al.*, 2004, Su, *et al.*, 2006, Peh, *et al.*, 2007, Teh, *et al.*, 2007, Habauzit, *et al.*, 2008). Une telle organisation conduit à une immobilisation massive de cibles ADN à la surface. Cette forte densité doit vraisemblablement engendrer un encombrement stérique, des contraintes dans l'agencement des séquences bicaténares et favoriser le phénomène de recapture. Ces inconvénients sont susceptibles d'avoir un impact négatif sur la spécificité et la cinétique de l'interaction du RE avec l'ADN.

La caractérisation, en parallèle, de notre biocapteur par AFM nous a permis de confirmer que ce prototype permettait une présentation de l'ADN de façon contrôlée dans un environnement dynamique. Une telle architecture favorise l'agencement des cibles sous contraintes réduites tant au niveau de la conformation que de l'encombrement stérique. De plus, la faible densité de cible à la surface du biocapteur tend à limiter la recapture des analytes.

Le deuxième biocapteur (**prototype « C11/C16 »**) repose sur l'utilisation d'une SAM mixte composée de 10% de HS-C₁₅-COOH qui permettent, après activation par un mélange EDC/NHS, l'immobilisation d'oligonucléotides couplés à une amine primaire *via* une chaîne aliphatique à 12 carbones au niveau de leurs extrémités 5'. Frederix et collaborateurs ont montré que l'utilisation d'une SAM composée de 100% de HS-C₁₅-COOH engendrait un rendement d'immobilisation d'immunoglobulines réduit par rapport à une SAM mixte HS-C₁₁-OH / HS-C₁₅-COOH. Les auteurs expliquent que cette différence résulte d'une organisation bidimensionnelle HS-C₁₅-COOH dans la SAM homogène qui engendre l'imbrication des fonctions carboxyliques. Dans une SAM mixte, la faible proportion de HS-C₁₅-COOH réduit ce phénomène d'imbrication, augmentant ainsi l'accessibilité des fonctions carboxyliques (Frederix, *et al.*, 2003).

De plus, la modulation de la proportion de ces points d'ancrage dans une SAM mixte permet de pouvoir contrôler de façon précise la densité d'ADN. Par ailleurs, les 90% des HS-C₁₁-OH permettent une réduction des interactions non spécifiques des analytes injectés sur le biocapteur (Frederix, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2005). Cette propriété proviendrait vraisemblablement d'une répulsion de charges entre la surface et les molécules injectées.

Afin de générer une SAM mixte, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Par exemple, Valsesia et collaborateurs ont créé une surface présentant des « îlots » de HS-C₁₅-COOH isolés les uns des autres par une SAM d'hexadécane-thiol. Dans cette étude, les auteurs ont immobilisé des anticorps sur des HS-C₁₅-COOH préalablement activés, puis ils ont saturé les points d'ancrage libres par une protéine : l'Albumine Sérique Bovine (BSA). Ils ont ensuite injecté des antigènes et en ont quantifié la proportion reconnue par une méthode de type sandwich. Selon eux, une telle architecture permet une augmentation de l'intensité du signal d'interaction d'un facteur 4 par rapport à une surface « non structurée » (Valsesia, *et al.*, 2006). Cette stratégie confère un contrôle au niveau de la localisation des points

d'ancrage. Cependant, une telle approche engendre une forte densité de surface de points d'ancrage au sein d'un « îlot », ce qui conduit à une forte quantité de protéines en un même point. On peut donc supposer qu'une telle organisation produit un fort encombrement stérique et facilite le phénomène de recapture, ce qui devrait avoir pour conséquence l'apparition de biais cinétiques. De plus, cette architecture est limitée en raison de la faible densité « d'îlots » par unité de surface.

Nous avons donc opté pour une stratégie d'autoassemblage à partir d'un mélange de HS-C₁₁-OH et HS-C₁₅-COOH. De plus, afin d'obtenir une faible densité d'ADN à la surface, nous n'avons pas dépassé une proportion de 10% de points d'ancrage. Nous avons observé qu'une forte densité d'oligonucléotides simples brins immobilisés par autoassemblage à la surface d'une puce d'or conduit à un taux d'hybridation non optimal (environ 30%) (Pieralli, *et al.*, 2009). Or, l'immobilisation d'oligonucléotides à la surface du prototype « C11/C16 » permet d'obtenir rapidement (deux minutes à 2,5 µM) un rendement d'hybridation supérieur à 70%. Une telle biorecognition tend à prouver que notre modèle ne présente pas de gênes stériques et laisse supposer que la répartition des points d'ancrage est homogène à la surface du biocapteur et non sous forme « d'îlots ».

Cette stratégie nous a ainsi permis d'étudier l'interaction RE/ERE dans un environnement contrôlé qui facilitait la détection d'interactions en se rapprochant au plus près de la réalité biologique.

1.2. Performance des biocapteurs RE/ERE

L'instabilité au cours du temps du RE α (Pillon, *et al.*, 2005) s'est avérée être un problème majeur lors de l'étude des interactions RE/ERE à l'aide de notre **prototype « lipidique »**. En effet, cette protéine recombinante de nature hydrophile tend à présenter rapidement un comportement hydrophobe incompatible avec l'utilisation d'une monocouche

lipidique. Cependant, ce prototype reste certainement très efficace pour étudier l'interaction d'autres facteurs de transcription, plus stables, avec une cible nucléotidique.

Afin d'atteindre notre objectif d'identification de molécules estrogéniques, nous avons choisi d'élaborer un nouveau prototype de biocapteur pourvu d'une surface hydrophile plus dense moléculairement et plus rigide qu'une monocouche phospholipidique. Ainsi, le **prototype « C11/C16 »** nous a permis d'éliminer les artéfacts résultant de l'instabilité du RE α . De plus, nous avons mis en évidence une interaction spécifique du RE α avec l'ERE à l'aide de ce biocapteur. Afin de pouvoir comparer les performances de ce biocapteur aux autres études déjà publiées, nous avons utilisé une séquence nucléotidique contenant le même ERE que celui présenté à la surface des autres biocapteurs (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Asano, *et al.*, 2004, Su, *et al.*, 2006, Peh, *et al.*, 2007, Teh, *et al.*, 2007, Habauzit, *et al.*, 2008). Il s'agit de l'ERE consensus (ou parfait) initialement identifié dans l'œuf de Xénope en amont (UTR 5') du gène de la *vitellogénine A2* (Klein-Hitpass, *et al.*, 1986). Le choix de la cible nucléotidique est une étape critique pour étudier l'interaction du RE α avec l'ADN. En effet, certaines études ont montré que des variations dans la séquence nucléotidique de l'ERE affectaient l'affinité des RE pour l'ADN. Il a aussi été montré que le RE α était plus sensible que le RE β à ce type de variations (Su, *et al.*, 2006, Teh, *et al.*, 2007). Ceci confirme les données établies précédemment par Loven et collaborateurs et permettrait d'expliquer l'hypothèse selon laquelle la cible nucléotidique orienterait le choix du type de RE interagissant avec elle (Loven, *et al.*, 2001a, Loven, *et al.*, 2001b, Wood, *et al.*, 2001, Yi, *et al.*, 2002).

Comme d'autres équipes, nous avons observé une interaction du RE avec l'ERE en absence de ligand (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Peh, *et al.*, 2007). Cependant, ces systèmes *in vitro* diffèrent de la réalité biologique par l'absence de protéines chaperons liées au récepteur, en absence de ligand. Qu'en est-il de cette interaction en absence de ligand

mais en présence de protéine de stress thermique ? Kostelac et collaborateurs ont émis l'hypothèse que, *in vivo*, l'interaction de la protéine chaperon avec le RE masquerait le DBD du récepteur, empêchant ainsi la liaison avec l'ADN en absence de ligand (Kostelac, *et al.*, 2003). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait pertinent de pouvoir étudier le comportement du RE α en présence de protéines HSP.

De plus, nous avons montré, en accord avec la littérature, que l'interaction du RE α avec l'ADN pouvait être modulée par la nature des ligands préalablement incubés avec les récepteurs (Cheskis, *et al.*, 1997, Kostelac, *et al.*, 2003, Asano, *et al.*, 2004, Peh, *et al.*, 2007). En effet, l'incubation préalable du RE α avec une proportion équimolaire de E₂ a entraîné une interaction spécifique RE/ERE environ deux fois supérieure à celle mesurée en absence de ligand. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kostelac et collaborateurs (Kostelac, *et al.*, 2003). La liaison de l'estradiol avec le RE α induit l'homodimérisation du récepteur puis sa liaison à l'ERE (Gruber, *et al.*, 2002). Or, la SPR permet de mesurer une quantité de matière en interaction avec la surface. On peut donc supposer que le même nombre de cible nucléotidique a été reconnu. En absence de ligand, le RE α a interagi avec l'ERE sous forme de monomère, alors qu'en présence de E₂, il a interagi sous forme d'homodimère.

L'incubation du RE α avec l'ICI 182,780, un antagoniste pur du récepteur, limite l'interaction RE/ERE. En effet, il a été montré par EMSA que l'ICI 182,780 empêchait la liaison du RE α avec l'ADN (Arbuckle, *et al.*, 1992). Par ailleurs, la liaison du RE α en présence de E₂ est abolie en présence d'ICI 182,780. Dans notre expérience, l'antagoniste est en large excès par rapport à l'hormone. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : (1) L'excès d'ICI 182,780 pourrait empêcher la liaison de E₂ au récepteur, limitant ainsi l'interaction RE/ERE. (2) La présence de l'antagoniste déstabiliserait les dimères E₂-ER-ER-E₂, bloquant ainsi leurs liaisons à l'ADN. Cette seconde hypothèse est en accord avec les

travaux de Wang et collaborateurs qui ont observé ce phénomène par double-hybride (Wang, *et al.*, 1995).

Enfin, on ne peut pas parler de performances du biocapteur sans comparer le niveau du signal de la réponse non spécifique par rapport au niveau de réponse spécifique. Cependant, il est difficile de comparer nos résultats à ceux obtenus par les autres équipes. En effet, les diverses études diffèrent en de nombreux points. Ces différences concernent l'appareil SPR utilisé, le type de puce, la concentration du RE, le temps d'incubation avec le ligand, la densité d'ADN à la surface du biocapteur, le débit d'injection ainsi que la composition du tampon. Or, il a été montré que la liaison du RE à l'ADN était influencée par la concentration saline du milieu (Teh, *et al.*, 2007). De plus, lors de la mise au point de notre capteur, nous avons observé que l'absence de DTT dans le tampon engendrait un signal non spécifique et une instabilité de l'interaction RE/ERE. En revanche, en présence de 1 mM de DTT, l'interaction observée était beaucoup plus stable et le signal sur la piste contrôle était considérablement réduit. Ces observations indiquent que la composition du tampon d'injection du RE α est un facteur important dans la spécificité de l'interaction étudiée. Par ailleurs, certains travaux ont été réalisés en absence de séquence contrôle (Asano, *et al.*, 2004, Habauzit, *et al.*, 2008). D'autres ont présenté une grande variabilité dans la séquence nucléotidique de l'ADN contrôle. Toutefois, dans notre étude la proportion de signal non spécifique était de $27,5 \pm 7,6\%$, ce qui place notre capteur dans la même gamme que les études précédentes dans lesquelles cette proportion variait de 10 à 50% (Cheskis, *et al.*, 1997, Peh, *et al.*, 2007, Teh, *et al.*, 2007, Yang, *et al.*, 2007). Il est à noter que nous souhaitons développer une méthode de pré-criblage rapide. Ainsi, les injections de RE, en présence des différentes molécules, ont été effectuées sur un laps de temps court (3 min). Les sensorgrammes, présentés à titre d'exemple Figure 31 A, ont montré que le signal d'interaction RE/séquence contrôle arrivait rapidement à un plateau. En revanche, lors de

l'injection du RE sur la piste présentant l'ERE, l'allure de la courbe en fin d'injection correspondait encore à un phénomène d'association. Il est fort probable qu'une augmentation du temps d'injection permettrait d'augmenter la réponse spécifique sans changer le niveau d'interaction non spécifique. En effet, en présence de E₂, nous avons observé une réponse spécifique de 157 RU correspondant à 2,33 fmol/mm² de RE α soit 17% de reconnaissance des ERE. On peut raisonnablement supposer qu'une injection plus longue devrait permettre une reconnaissance de 50% des ERE. La proportion de signal non spécifique pourrait alors être réduite à moins de 10%.

2. Identification d'un nouveau phytoestrogène

Le **prototype « C11/C16 »** nous a permis d'identifier un nouveau phytoestrogène : la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin. En effet, l'incubation préalable du RE α avec un excès de ce flavonoïde a favorisé l'interaction spécifique du récepteur avec l'ERE. L'interaction RE/ERE observée en présence de cette molécule est 1,4 fois plus importante qu'en absence de ligand. Cependant, Asano et collaborateurs ont montré dans leur étude qu'il était impossible de déterminer la nature agoniste ou antagoniste d'un composé en ne s'intéressant qu'au seul signal d'interaction (Asano, *et al.*, 2004). De plus, l'interaction du RE avec l'ADN est indispensable mais non suffisante à la transactivation d'un gène cible. En effet, la structure chimique du ligand agit sur la conformation du récepteur lui conférant ou non l'aptitude à recruter des coactivateurs indispensables à l'expression génique. Afin de déterminer la nature agoniste ou antagoniste de cette nouvelle molécule, nous avons, en parallèle, développé un modèle cellulaire MCF-7 transfecté par un vecteur rapporteur pourvu de deux ERE. Ce modèle nous a permis de démontrer que la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin induisait la transactivation d'un gène rapporteur par l'intermédiaire du RE α .

Par ailleurs, nous avons pu observer que cette molécule présentait la même activité transactivatrice que sa forme déglycosylée. Cette similitude n'a pas été observée lors de l'étude de la 8-C- β -D-glucopyranosylgénistéine et de sa forme déglycosylée. Le résidu glucidique, hydrophile, pourrait empêcher la diffusion d'une molécule glycosylée à travers la membrane plasmique. En effet, Yuan et collaborateurs ont montré que les cellules cancéreuses exprimaient à leurs surfaces une β -glucuronidase capable de métaboliser la 7-O- β -glucucurolylgénistéine en génistéine. Les auteurs ont ainsi pu expliquer l'effet antiprolifératif de ce glucuronide sur les cellules cancéreuses, alors que cette même molécule n'avait aucun impact sur les cellules normales, dépourvues de cette enzyme membranaire (Yuan, *et al.*, 2003). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les cellules MCF-7 exprimeraient une β -glucosidase capable de cliver une liaison O-glycosylée, mais pas une liaison C-glycosylée. Cette hypothèse pourrait expliquer la différence observée entre l'effet transactivateur du RE α en présence de 7-O- β -D-glucopyranosylchryisine et l'absence d'effet suite à une stimulation par la 8-C- β -D-glucopyranosylgénistéine.

3. Homodimérisation de GEC1

Nymann-Andersen et collaborateurs ont montré par GST pull-down que la protéine GABARAP, qui présente une forte homologie avec GEC1, était capable de former des homodimères (Nymann-Andersen, *et al.*, 2002). Lors de nos travaux nous avons voulu savoir si GEC1 présentait la même propriété. Ainsi, nous avons confronté GST-GEC1 à notre capteur protéines/protéines présentant la protéine recombinante FLAG-GEC1-(His)₆. Il s'est avéré que GEC1 était capable de s'homodimériser. Cette homodimérisation *in vitro* a été confirmée par une expérience de GST pull-down. Cependant, le rôle biologique de ce mécanisme, s'il a lieu *in vivo*, reste encore à élucider. Notre équipe a montré que GEC1 favorisait la polymérisation de la tubuline et interagissait avec la sous unité γ 2 du récepteur

GABA_A. De plus, le niveau de polymérisation de la tubuline, en présence de MgCl₂ seul, peut être augmenté en présence de GEC1, on parle alors de « bundling » ou de groupement des microtubules (Mansuy, *et al.*, 2004). On peut supposer, qu'*in vitro*, chaque monomère de GEC1 interagirait avec un microtubule et que la dimérisation de cette protéine permettrait alors le regroupement des microtubules entre eux. En ce qui concerne le transport du récepteur GABA_A, Nyman-Andersen et collaborateurs ont montré que le domaine d'homodimérisation de GABARAP est le même que le domaine d'interaction avec le récepteur au GABA. Les auteurs ont donc supposé que ces deux mécanismes ne pouvaient pas se dérouler simultanément (Nyman-Andersen, *et al.*, 2002). Par analogie, on peut supposer que l'interaction GEC1-GEC1 devrait empêcher la liaison avec le récepteur au GABA.

Il est à noter que ces données résultent d'expériences préliminaires destinées à valider l'utilisation de notre biocapteur dans l'identification des partenaires protéiques de GEC1 à partir d'un échantillon complexe (lysate cellulaire). Il était donc nécessaire, dans un premier temps, d'étudier le comportement de notre modèle dans un contexte simplifié, à partir de protéines purifiées.

PERSPECTIVES

Lors de nos travaux, nous avons mis au point un modèle de biocapteur SPR, appelé **prototype « C11/C16 »**, dans le but d'identifier des molécules capables de moduler l'interaction du RE α avec l'ERE. Ce capteur nous a permis d'identifier un nouveau phytoestrogène : la 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin. L'étape suivante devra être l'étude de l'interaction du RE β avec l'ERE en présence de cette molécule par SPR, puis l'évaluation de l'efficacité transactivatrice de ce récepteur activé dans un modèle de cellules exprimant ce récepteur. La poursuite de la caractérisation de ce composé nécessiterait une étude de prolifération cellulaire. Cette expérience apporterait des précisions sur l'effet prolifératif de l'extrait méthanolique de *podocytisus caramanicus*. En effet, cette induction peut résulter du glucoside de chrysin ou d'une autre molécule, présente en proportion plus réduite dans la plante. Enfin, l'étude du potentiel transactivateur du RE α en présence de 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin, à l'aide d'un modèle de cellules non cancéreuses, devrait apporter des précisions sur la présence d'une glucosidase membranaire à la surface des cellules tumorales.

Le **prototype « C11/C16 »** que nous avons mis au point devrait permettre, à plus long terme, d'offrir une solution rapide et peu onéreuse à l'industrie pharmaceutique. En effet, il est possible de réaliser un précriblage des molécules potentiellement estrogéniques à l'aide de ce biocapteur, avant de mettre en place un modèle biologique plus onéreux. En effet, si le nombre de molécules à tester pouvait être réduit à l'aide de notre capteur en amont d'une étude cellulaire, il serait possible d'économiser du temps et de l'argent. Il est aussi tout à fait possible d'envisager d'utiliser notre **prototype « C11/C16 »** pour la détection de perturbateurs endocriniens, afin de répondre à des besoins d'ordre écologique ou de santé publique.

Par ailleurs, nos deux prototypes de biocapteurs ADN/protéine peuvent présenter un intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes d'interactions de divers facteurs de transcription avec leurs cibles nucléotidiques.

En ce qui concerne l'homodimérisation de GEC1, il est nécessaire de confirmer son existence *in vivo*, avant d'essayer de comprendre le rôle biologique de cette interaction, puis éventuellement la localisation cellulaire de ce complexe.

Notre biocapteur protéines/protéines a été élaboré dans le but d'identifier les partenaires protéiques de GEC1, à partir d'un échantillon complexe. Pour cela, il a été nécessaire de mettre en place des lignées cellulaires surexprimant la protéine FLAG-GEC1-(His)₆. Le capteur étant maintenant opérationnel, l'étape suivante sera sa confrontation avec un extrait cellulaire, puis l'analyse par spectroscopie de masse des protéines en interaction avec le biocapteur GEC1. Un tel modèle dépourvu de polymère permet le couplage BIA-MS directe (sans étape d'éluion des molécules capturées) (Boireau, *et al.*, 2008).

La mise au point de ces deux biocapteurs a permis de développer de façon fiable des modèles exploratoires pour les nanosciences. En effet, le **prototype « lipidique »**, de part ses propriétés dynamiques, pourrait être un modèle d'étude des interactions moléculaires. L'analyse de ce biocapteur par AFM à haute vitesse permettrait de visualiser en temps réel des mécanismes d'interactions à l'échelle moléculaire. Par ailleurs, le **prototype « C11/C16 »** permet de présenter des objets de façon individualisée. Une telle organisation facilite la quantification des interactions moléculaires par spectrométrie de force. De plus, l'utilisation d'une telle chimie de surface peut être appliquée à la fonctionnalisation de la pointe AFM, permettant ainsi d'immobiliser spécifiquement et de façon contrôlée un partenaire. Il serait donc possible d'étudier l'interaction GEC1/protéine X, RE/ERE, RE/ligand voire RE/RE en présence de ligand.

BIBLIOGRAPHIE

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P. et Marino, M. (2005). **"Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol."** Mol Biol Cell **16**(1): 231-7.

Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P. et Marino, M. (2004). **"S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions."** Biochem Biophys Res Commun **316**(3): 878-83.

Adlercreutz, H. (2002a). **"Phyto-oestrogens and cancer."** Lancet Oncol **3**(6): 364-373.

Adlercreutz, H. (2002b). **"Phytoestrogens and breast cancer."** J Steroid Biochem Mol Biol **83**(1-5): 113-8.

Altucci, L. et Gronemeyer, H. (2001). **"Nuclear receptors in cell life and death."** Trends Endocrinol Metab **12**(10): 460-8.

Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G. et Corasaniti, M. T. (2005). **"From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens."** Pharmacol Res **52**(2): 119-32.

Aoyagi, S., Rouleau, A. et Boireau, W. (2008). **"TOF-SIMS structural characterization of self-assembly monolayer of cytochrome b5 onto gold substrate."** Applied Surface Science in press; <http://doi:10.1016/j.apsusc.2008.05.086>

Arbuckle, N. D., Dauvois, S. et Parker, M. G. (1992). **"Effects of antioestrogens on the DNA binding activity of oestrogen receptors in vitro."** Nucleic Acids Res **20**(15): 3839-44.

Asano, K., Ono, A., Hashimoto, S., Inoue, T. et Kanno, J. (2004). **"Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor."** Anal Sci **20**(4): 611-616.

Ascenzi, P., Bocedi, A. et Marino, M. (2006). **"Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health."** Mol Aspects Med **27**(4): 299-402.

Axelson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B. E. et Setchell, K. D. (1982). **"Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants."** Nature **298**(5875): 659-60.

Bain, C. D. et Whitesides, G. M. (1988). **"Molecular-Level Control over Surface Order in Self-Assembled Monolayer Films of Thiols on Gold."** Science **240**(4848): 62-63.

Belguendouz, L., Fremont, L. et Gozzelino, M. T. (1998). **"Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins."** Biochem Pharmacol **55**(6): 811-6.

Berggren, K. K., Bard, A., Wilbur, J. L., Gillasp, J. D., Helg, A. G., McClelland, J. J., Rolston, S. L., Phillips, W. D., Prentiss, M. et Whitesides, G. M. (1995). **"Microlithography**

by using neutral metastable atoms and self-assembled monolayers." *Science* 269(5228): 1255-7.

Bergman Jungstrom, M., Thompson, L. U. et Dabrosin, C. (2007). **"Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo."** *Clin Cancer Res* 13(3): 1061-7.

Bibbo, M., Gill, W. B., Azizi, F., Blough, R., Fang, V. S., Rosenfield, R. L., Schumacher, G. F., Sleeper, K., Sonek, M. G. et Wied, G. L. (1977). **"Follow-up study of male and female offspring of DES-exposed mothers."** *Obstet Gynecol* 49(1): 1-8.

Blumenthal, R. S., Baranowski, B. et Dowsett, S. A. (2004). **"Cardiovascular effects of raloxifene: the arterial and venous systems."** *Am Heart J* 147(5): 783-9.

Boccardo, F., Puntoni, M., Guglielmini, P. et Rubagotti, A. (2006). **"Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of the published evidence."** *Clin Chim Acta* 365(1-2): 58-67.

Boireau, W., Bombard, S., Sari, M. A. et Pompon, D. (2002). **"Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes."** *Biotechnol Bioeng* 77(2): 225-231.

Boireau, W., Duncan, A. C. et Pompon, D. (2005a). **"Bioengineering and characterization of DNA-Protein assemblies floating on supported membranes."** *Methods in Molecular Biology*. T. V.-D. H. P. Inc. Totowa, NJ. **300**: 349-368.

Boireau, W., Rouleau, A., Lucchi, G. et Ducoroy, P. (2008). **"Revisited BIA-MS combination: Entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels."** *Biosensors Bioelectronics* in press; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.030>.

Boireau, W., Zeeh, J. C., Puig, P. E. et Pompon, D. (2005b). **"Unique supramolecular assembly of a redox protein with nucleic acids onto hybrid bilayer: towards a dynamic DNA chip."** *Biosens Bioelectron* 20(8): 1631-1637.

Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A. et Mitra, S. (2003). **"Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada."** *Sci Total Environ* 311(1-3): 135-49.

Bradlow, H. L. et Sepkovic, D. W. (2004). **"Steroids as procarcinogenic agents."** *Ann N Y Acad Sci* 1028: 216-32.

Briand, E., Salmain, M., Compere, C. et Pradier, C. M. (2006). **"Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors."** *Colloids Surf B Biointerfaces* 53(2): 215-24.

Brooks, S. C., Locke, E. R. et Soule, H. D. (1973). **"Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma."** *J Biol Chem* 248(17): 6251-3.

Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. et Carlquist, M. (1997). **"Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor."** Nature **389**(6652): 753-8.

Butler, J. E., Ni, L., Brown, W. R., Joshi, K. S., Chang, J., Rosenberg, B. et Voss, E. W., Jr. (1993). **"The immunochemistry of sandwich ELISAs--VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CABs) are denatured by passive adsorption."** Mol Immunol **30**(13): 1165-75.

Buzdar, A., O'Shaughnessy, J. A., Booser, D. J., Pippen, J. E., Jr., Jones, S. E., Munster, P. N., Peterson, P., Melemed, A. S., Winer, E. et Hudis, C. (2003). **"Phase II, randomized, double-blind study of two dose levels of arzoxifene in patients with locally advanced or metastatic breast cancer."** J Clin Oncol **21**(6): 1007-14.

Castagnetta, L., Granata, O. M., Cocciadiferro, L., Saetta, A., Polito, L., Bronte, G., Rizzo, S., Campisi, I., Agostara, B. et Carruba, G. (2004). **"Sex steroids, carcinogenesis, and cancer progression."** Ann N Y Acad Sci **1028**: 233-46.

Chaki, N. K. et Vijayamohan, K. (2002). **"Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications."** Biosens Bioelectron **17**(1-2): 1-12.

Chatterjee, A., Moulik, S. P., Majhi, P. R. et Sanyal, S. K. (2002). **"Studies on surfactant-biopolymer interaction. I. Microcalorimetric investigation on the interaction of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS) with gelatin (Gn), lysozyme (Lz) and deoxyribonucleic acid (DNA)."** Biophys Chem **98**(3): 313-27.

Chen, C., Li, J. G., Chen, Y., Huang, P., Wang, Y. et Liu-Chen, L. Y. (2006). **"GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor."** J Biol Chem **281**(12): 7983-93.

Chen, J. D. et Evans, R. M. (1995). **"A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors."** Nature **377**(6548): 454-7.

Chen, W. F., Huang, M. H., Tzang, C. H., Yang, M. et Wong, M. S. (2003). **"Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells."** Biochim Biophys Acta **1638**(2): 187-196.

Cheskis, B. J., Karathanasis, S. et Lyttle, C. R. (1997). **"Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA."** J Biol Chem **272**(17): 11384-11391.

Clapp, R. W., Jacobs, M. M. et Loechler, E. L. (2008). **"Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007."** Rev Environ Health **23**(1): 1-37.

Cohen, F. J. et Lu, Y. (2000). **"Characterization of hot flashes reported by healthy postmenopausal women receiving raloxifene or placebo during osteoporosis prevention trials."** Maturitas **34**(1): 65-73.

Cohen, F. J., Watts, S., Shah, A., Akers, R. et Plouffe, L., Jr. (2000). **"Uterine effects of 3-year raloxifene therapy in postmenopausal women younger than age 60."** Obstet Gynecol **95**(1): 104-10.

Cornwell, T., Cohick, W. et Raskin, I. (2004). **"Dietary phytoestrogens and health."** Phytochemistry **65**(8): 995-1016.

Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Vanden Berghe, D., Pieters, L. et Vlietinck, A. J. (2003). **"Phytoestrogens: recent developments."** Planta Med **69**(7): 589-99.

Cui, X., Yang, F., Li, A. et Yang, X. (2005). **"Chip surface charge switch for studying histone-DNA interaction by surface plasmon resonance biosensor."** Anal Biochem **342**(1): 173-5.

D'Incalci, M., Brunelli, D., Marangon, E., Simone, M., Tavecchio, M., Gescher, A. et Mantovani, R. (2007). **"Modulation of gene transcription by natural products--a viable anticancer strategy."** Curr Pharm Des **13**(27): 2744-50.

Dauvois, S., White, R. et Parker, M. G. (1993). **"The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling."** J Cell Sci **106** (Pt 4): 1377-88.

de Cremoux, P., Tran-Perennou, C., Brockdorff, B. L., Boudou, E., Brunner, N., Magdelenat, H. et Lykkesfeldt, A. E. (2003). **"Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens."** Endocr Relat Cancer **10**(3): 409-18.

Dean, D. M. et Sanders, M. M. (1996). **"Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes."** Mol Endocrinol **10**(12): 1489-95.

Delmas, P. D., Bjarnason, N. H., Mitlak, B. H., Ravoux, A. C., Shah, A. S., Huster, W. J., Draper, M. et Christiansen, C. (1997). **"Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women."** N Engl J Med **337**(23): 1641-1647.

Deroo, B. J. et Korach, K. S. (2006). **"Estrogen receptors and human disease."** J Clin Invest **116**(3): 561-70.

Desta, Z., Ward, B. A., Soukhova, N. V. et Flockhart, D. A. (2004). **"Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6."** J Pharmacol Exp Ther **310**(3): 1062-75.

Dhandapani, K. M. et Brann, D. W. (2002). **"Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain."** Biol Reprod **67**(5): 1379-1385.

Dieci, G., Bottarelli, L., Ballabeni, A. et Ottonello, S. (2000). **"tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins."** Protein Expr Purif **18**(3): 346-54.

Diel, P. (2002). **"Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms."** Toxicol Lett **127**(1-3): 217-224.

Dijsselbloem, N., Vanden Berghe, W., De Naeyer, A. et Haegeman, G. (2004). **"Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy."** Biochem Pharmacol **68**(6): 1171-1185.

Dodds, E. C., Goldberg, L., Lawson, W. et Robison, R. (1938). **"Estrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds."** Nature **141**: 247-248.

Dodge, J. A., Glasebrook, A. L., Magee, D. E., Phillips, D. L., Sato, M., Short, L. L. et Bryant, H. U. (1996). **"Environmental estrogens: effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat."** J Steroid Biochem Mol Biol **59**(2): 155-61.

Dong, L., Wang, W., Wang, F., Stoner, M., Reed, J. C., Harigai, M., Samudio, I., Kladdé, M. P., Vyhlidal, C. et Safe, S. (1999). **"Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells."** J Biol Chem **274**(45): 32099-107.

Doren, M., Rubig, A., Coelingh Bennink, H. J. et Holzgreve, W. (2001). **"Differential effects on the androgen status of postmenopausal women treated with tibolone and continuous combined estradiol and norethindrone acetate replacement therapy."** Fertil Steril **75**(3): 554-9.

Draper, C. R., Edel, M. J., Dick, I. M., Randall, A. G., Martin, G. B. et Prince, R. L. (1997). **"Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats."** J Nutr **127**(9): 1795-9.

Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S. et Comhaire, F. (2003). **"Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment."** Toxicol In Vitro **17**(5-6): 515-24.

Elbert, D. L. et Hubbell, J. A. (1998). **"Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers."** Chem Biol **5**(3): 177-83.

Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. et Gustafsson, J. A. (1997). **"Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern."** J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4258-65.

Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavailles, V. et Balaguer, P. (2006). **"Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta."** Biochem Pharmacol **71**(10): 1459-69.

Escriva, H., Bertrand, S. et Laudet, V. (2004). **"The evolution of the nuclear receptor superfamily."** Essays Biochem **40**: 11-26.

Etienne, M. et Dourmad, J. (1994). **"Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review."** Livestock Prod. Sci **40**: 99-113.

Fabian, C. J., Kimler, B. F., Anderson, J., Tawfik, O. W., Mayo, M. S., Burak, W. E., Jr., O'Shaughnessy, J. A., Albain, K. S., Hyams, D. M., Budd, G. T., Ganz, P. A., Sauter, E. R., Beenken, S. W., Grizzle, W. E., Fruehauf, J. P., Arneson, D. W., Bacus, J. W., Lagios, M. D., Johnson, K. A. et Browne, D. (2004). **"Breast cancer chemoprevention phase I evaluation of biomarker modulation by arzoxifene, a third generation selective estrogen receptor modulator."** Clin Cancer Res **10**(16): 5403-17.

Feng, J., Shi, Z. et Ye, Z. (2008). **"Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells."** Biol Pharm Bull **31**(6): 1067-70.

Fields, S. et Song, O. (1989). **"A novel genetic system to detect protein-protein interactions."** Nature **340**(6230): 245-6.

Filardo, E. J. et Thomas, P. (2005). **"GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release."** Trends Endocrinol Metab **16**(8): 362-7.

Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V. et Gannon, F. (2000). **"Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1."** Embo J **19**(17): 4688-700.

Fokialakis, N., Lambrinidis, G., Mitsiou, D. J., Aligiannis, N., Mitakou, S., Skaltsounis, A. L., Pratsinis, H., Mikros, E. et Alexis, M. N. (2004). **"A new class of phytoestrogens; evaluation of the estrogenic activity of deoxybenzoins."** Chem Biol **11**(3): 397-406.

Fong, C. C., Wong, M. S., Fong, W. F. et Yang, M. (2002). **"Effect of hydrogel matrix on binding kinetics of protein-protein interactions on sensor surface."** Analytica Chimica Acta **456**(2): 201-208.

Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M. et Narala, K. (1995). **"Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine."** Proc Soc Exp Biol Med **208**(1): 18-26.

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L. et Kinsella, J. E. (1993). **"Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol."** Lancet **341**(8852): 1103-4.

Frederix, F., Bonroy, K., Laureyn, W., Reekmans, G., Campitelli, A., Dehaen, W. et Maes, G. (2003). **"Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold."** Langmuir **19**(10): 4351-4357.

Frederix, F., Bonroy, K., Reekmans, G., Laureyn, W., Campitelli, A., Abramov, M. A., Dehaen, W. et Maes, G. (2004). **"Reduced nonspecific adsorption on covalently immobilized protein surfaces using poly(ethylene oxide) containing blocking agents."** J Biochem Biophys Methods **58**(1): 67-74.

Fremont, L. (2000). **"Biological effects of resveratrol."** Life Sci **66**(8): 663-73.

Fried, M. et Crothers, D. M. (1981). **"Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis."** Nucleic Acids Res **9**(23): 6505-25.

Fried, M. G. (1989). **"Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay."** Electrophoresis **10**(5-6): 366-76.

Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J. et McDonnell, D. P. (1997). **"Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay."** Toxicol Appl Pharmacol **143**(1): 205-12.

Galas, D. J. et Schmitz, A. (1978). **"DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity."** Nucleic Acids Res **5**(9): 3157-70.

Gallagher, J. C., Baylink, D. J., Freeman, R. et McClung, M. (2001). **"Prevention of bone loss with tibolone in postmenopausal women: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies."** J Clin Endocrinol Metab **86**(10): 4717-26.

Gast, M. J., Sims, H. F., Murdock, G. L., Gast, P. M. et Strauss, A. W. (1989). **"Isolation and sequencing of a complementary deoxyribonucleic acid clone encoding human placental 17 beta-estradiol dehydrogenase: identification of the putative cofactor binding site."** Am J Obstet Gynecol **161**(6 Pt 1): 1726-31.

Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P. et Sassone-Corsi, P. (1990). **"Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex."** Cell **63**(6): 1267-76.

Genazzani, A. R., Petraglia, F., Facchinetti, F., Genazzani, A. D., Bergamaschi, M., Grasso, A. et Volpe, A. (1987). **"Effects of Org OD 14 on pituitary and peripheral beta-endorphin in castrated rats and post-menopausal women."** Maturitas Suppl **1**: 35-48.

Gniazdowski, M., Denny, W. A., Nelson, S. M. et Czyz, M. (2005). **"Effects of anticancer drugs on transcription factor-DNA interactions."** Expert Opin Ther Targets **9**(3): 471-89.

Gobi, K. V., Iwasaka, H. et Miura, N. (2007a). **"Self-assembled PEG monolayer based SPR immunosensor for label-free detection of insulin."** Biosens Bioelectron **22**(7): 1382-9.

Gobi, K. V., Kim, S. J., Tanaka, H., Shoyama, Y. et Miura, N. (2007b). **"Novel surface plasmon resonance (SPR) immunosensor based on monomolecular layer of physically-adsorbed ovalbumin conjugate for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and atomic force microscopy study."** Sens Actuators B **123**: 583-593.

Gosden, J. R., Middleton, P. G. et Rout, D. (1986). **"Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization."** Cytogenet Cell Genet **43**(3-4): 218-20.

Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Wilson, V., Lambright, C., Bobseine, K., Hartig, P., Hotchkiss, A., Wolf, C., Furr, J., Price, M., Parks, L., Cooper, R. L., Stoker, T. E., Laws, S. C., Degitz, S. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, E. A., Tietge, J. E. et Ankley, G. T. (2002). **"Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing: filling key data gaps."** Toxicology **181-182**: 371-82.

Green, F., O'Hare, T., Blackwell, A. et Enns, C. A. (2002). **"Association of human transferrin receptor with GABARAP."** FEBS Lett **518**(1-3): 101-6.

Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P. et Chambon, P. (1986a). **"Structural and functional domains of the estrogen receptor."** Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 2**: 751-8.

Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. et Chambon, P. (1986b). **"Cloning of the human oestrogen receptor cDNA."** J Steroid Biochem **24**(1): 77-83.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. et Chambon, P. (1986c). **"Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A."** Nature **320**(6058): 134-9.

Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. et Shine, J. (1986). **"Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA."** Science **231**(4742): 1150-4.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A. et Laudet, V. (2004). **"Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily."** Nat Rev Drug Discov **3**(11): 950-64.

Gronemeyer, H. et Laudet, V. (1995). **"Transcription factors 3: nuclear receptors."** Protein Profile **2**(11): 1173-308.

Grosjean, L., Cherif, B., Mercey, E., Roget, A., Levy, Y., Marche, P. N., Villiers, M. B. et Livache, T. (2005). **"A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process."** Anal Biochem **347**(2): 193-200.

Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. et Huber, J. C. (2002). **"Production and actions of estrogens."** N Engl J Med **346**(5): 340-52.

Gusman, J., Malonne, H. et Atassi, G. (2001). **"A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol."** Carcinogenesis **22**(8): 1111-7.

Gutendorf, B. et Westendorf, J. (2001). **"Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens."** Toxicology **166**(1-2): 79-89.

Habauzit, D., Armengaud, J., Roig, B. et Chopineau, J. (2008). **"Determination of estrogen presence in water by SPR using estrogen receptor dimerization."** Anal Bioanal Chem **390**(3): 873-83.

Habauzit, D., Chopineau, J. et Roig, B. (2007). **"SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds."** Anal Bioanal Chem **387**(4): 1215-23.

Harkonen, P. L. et Makela, S. I. (2004). **"Role of estrogens in development of prostate cancer."** J Steroid Biochem Mol Biol **92**(4): 297-305.

Herbst, A. L., Ulfelder, H. et Poskanzer, D. C. (1971). **"Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women."** N Engl J Med **284**(15): 878-81.

Ho, P. W., Garner, C. E., Ho, J. W., Leung, K. C., Chu, A. C., Kwok, K. H., Kung, M. H., Burka, L. T., Ramsden, D. B. et Ho, S. L. (2008). **"Estrogenic phenol and catechol metabolites of PCBs modulate catechol-O-methyltransferase expression via the estrogen receptor: potential contribution to cancer risk."** Curr Drug Metab **9**(4): 304-9.

Homola, J., Yee, S. S. et Gauglitzb, G. (1999). **"Surface plasmon resonance sensors: review."** Sensors and Actuators B: Chemical **54**(1-2): 3-15.

Hoogenboom, L. A. P., de Haan, L., Hooijerink, D., Bor, G., Murk, A. J. et Brouwer, A. (2001). **"Estrogenic activity of estradiol and its metabolites in the ER-CALUX assay with human T47D breast cells."** Apmis **109**(2): 101-7.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et et al. (1995). **"Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor."** Nature **377**(6548): 397-404.

Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J. M., Frederix, F., Francis, L., Muyldermans, S., Campitelli, A. et Van Hoof, C. (2005). **"Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays."** Biosens Bioelectron **21**(3): 483-90.

Inadera, H. (2006). **"The immune system as a target for environmental chemicals: Xenooestrogens and other compounds."** Toxicol Lett **164**(3): 191-206.

Jacobsen, D. E., Samson, M. M., Schouw, Y. T., Grobbee, D. E. et Verhaar, H. J. (2008). **"Efficacy of tibolone and raloxifene for the maintenance of skeletal muscle strength, bone mineral density, balance, body composition, cognitive function, mood/depression, anxiety and quality of life/well-being in late postmenopausal women >= 70 years: Study design of a randomized, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, single-center trial."** Trials **9**: 32.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C. et Pezzuto, J. M. (1997). **"Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes."** Science **275**(5297): 218-20.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. et Sumpter, J. P. (1998). **"Widespread Sexual Disruption in Wild Fish."** Environ. Sci. Technol. **32**: 2498-2506.

Jordan, V. C. et Morrow, M. (1999). **"Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer."** Endocr Rev **20**(3): 253-278.

Kanematsu, T. et Hirata, M. (2002). **"[The analysis of protein-protein interaction with special reference to PRIP-1]."** Nippon Yakurigaku Zasshi **119**(4): 241-6.

Kerry, N. L. et Abbey, M. (1997). **"Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro."** Atherosclerosis **135**(1): 93-102.

Kim, H. P., Lee, J. Y., Jeong, J. K., Bae, S. W., Lee, H. K. et Jo, I. (1999). **"Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae."** Biochem Biophys Res Commun **263**(1): 257-62.

Kim, J. C., Kang, H. J., Lee, D. H., Lee, Y. W. et Yoshizawa, T. (1993). **"Natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea."** Appl Environ Microbiol **59**(11): 3798-802.

Kittler, J. T., Arancibia-Carcamo, I. L. et Moss, S. J. (2004). **"Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses."** Biochem Pharmacol **68**(8): 1649-54.

Kittler, J. T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J. M., Olsen, R., Triller, A. et Moss, S. J. (2001). **"The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors."** Mol Cell Neurosci **18**(1): 13-25.

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U. et Ryffel, G. U. (1986). **"An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells."** Cell **46**(7): 1053-61.

Klinge, C. M. (2001). **"Estrogen receptor interaction with estrogen response elements."** Nucleic Acids Res **29**(14): 2905-2919.

Kneussel, M., Haverkamp, S., Fuhrmann, J. C., Wang, H., Wassle, H., Olsen, R. W. et Betz, H. (2000). **"The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse."** Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8594-9.

Knight, D. C. et Eden, J. A. (1995). **"Phytoestrogens--a short review."** Maturitas **22**(3): 167-175.

Kos, M., Reid, G., Denger, S. et Gannon, F. (2001). **"Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region."** Mol Endocrinol **15**(12): 2057-63.

Kostelac, D., Rechkemmer, G. et Briviba, K. (2003). **"Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element."** J Agric Food Chem **51**(26): 7632-7635.

Kouno, T., Mizuguchi, M., Tanida, I., Ueno, T., Kanematsu, T., Mori, Y., Shinoda, H., Hirata, M., Kominami, E. et Kawano, K. (2005). **"Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains."** J Biol Chem **280**(26): 24610-7.

Kramer, P. M., Gouzy, M. F., Kess, M., Kleinschmidt, U. et Kremmer, E. (2008). **"Development and characterization of new rat monoclonal antibodies for procalcitonin."** Anal Bioanal Chem.

Kraus, W. L., McInerney, E. M. et Katzenellenbogen, B. S. (1995). **"Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor."** Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12314-8.

Kretschmann, E. et Raether, H. (1968). **"Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light."** Z. Naturforsch. **23**: 2135–2136.

Krone, J. R., Nelson, R. W., Dogruel, D., Williams, P. et Granzow, R. (1997). **"BIA/MS: interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry."** Anal Biochem **244**(1): 124-32.

Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. et Gustafsson, J. A. (1996). **"Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary."** Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.

Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. et Gustafsson, J. A. (1998). **"Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta."** Endocrinology **139**(10): 4252-63.

Kumar, R. et Thompson, E. B. (1999). **"The structure of the nuclear hormone receptors."** Steroids **64**(5): 310-9.

Kumar, R. et Thompson, E. B. (2003). **"Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions."** Mol Endocrinol **17**(1): 1-10.

Lahav, M., Weiss, E. A., Xu, Q. et Whitesides, G. M. (2006). **"Core-shell and segmented polymer-metal composite nanostructures."** Nano Lett **6**(9): 2166-71.

Laibinis, P. E., Hickman, J. J., Wrighton, M. S. et Whitesides, G. M. (1989). **"Orthogonal Self-Assembled Monolayers: Alkanethiols on Gold and Alkane Carboxylic Acids on Alumina."** Science **245**(4920): 845-847.

Landel, C. C., Kushner, P. J. et Greene, G. L. (1995). **"Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions."** Environ Health Perspect **103** Suppl 7: 23-8.

Landgren, M. B., Bennink, H. J., Helmond, F. A. et Engelen, S. (2002). **"Dose-response analysis of effects of tibolone on climacteric symptoms."** Bjog **109**(10): 1109-14.

Laudet, V., Auwerx, J., Gustafsson, J. A. et Walter Wahli, W. (1999). **"A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily."** Cell **97**(2): 161-163.

Lazennec, G., Alcorn, J. L. et Katzenellenbogen, B. S. (1999). **"Adenovirus-mediated delivery of a dominant negative estrogen receptor gene abrogates estrogen-stimulated gene expression and breast cancer cell proliferation."** Mol Endocrinol **13**(6): 969-80.

Lecaruyer, P., Canva, M. et Rolland, J. (2007). **"Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method."** Appl Opt **46**(12): 2361-9.

Lee, J. H., Rho, S. B. et Chun, T. (2005). **"GABAA receptor-associated protein (GABARAP) induces apoptosis by interacting with DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 47 (DDX 47)."** Biotechnol Lett **27**(9): 623-8.

Legrain, P., Dokhelar, M. C. et Transy, C. (1994). **"Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system."** Nucleic Acids Res **22**(15): 3241-2.

Li, H. F., Chen, S. A. et Wu, S. N. (2000). **"Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells."** Cardiovasc Res **45**(4): 1035-45.

Liedberg, B., Lundström, I. et Stenberg, E. (1993). **"Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance."** Sens. Actuators B **11**: 63-72.

Liu, S., Abdelrahim, M., Khan, S., Ariazi, E., Jordan, V. C. et Safe, S. (2006). **"Aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells."** Biol Chem **387**(9): 1209-13.

Löfas, S. et Johnsson, B. (1990). **"A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands."** J. Chem. Soc. Chem. Commun. **21**: 1526-1528.

Lookhart, G. (1979). **"Note on improving method of extracting and quantitating coumestrol from soybeans."** Cereal Chem. **56**: 386-388.

Love, R. R., Wiebe, D. A., Feyzi, J. M., Newcomb, P. A. et Chappell, R. J. (1994). **"Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment."** J Natl Cancer Inst **86**(20): 1534-9.

Loven, M. A., Likhite, V. S., Choi, I. et Nardulli, A. M. (2001a). **"Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor beta conformation."** J Biol Chem **276**(48): 45282-8.

Loven, M. A., Wood, J. R. et Nardulli, A. M. (2001b). **"Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements."** Mol Cell Endocrinol **181**(1-2): 151-63.

Luu The, V., Labrie, C., Zhao, H. F., Couet, J., Lachance, Y., Simard, J., Leblanc, G., Cote, J., Berube, D., Gagne, R. et al. (1989). **"Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta."** Mol Endocrinol **3**(8): 1301-9.

Magee, P. J. et Rowland, I. R. (2004). **"Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer."** Br J Nutr **91**(4): 513-531.

Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D. et Ando, S. (2001). **"Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells."** Mol Pharmacol **60**(3): 595-602.

Maillart, E., Brengel-Pesce, K., Capela, D., Roget, A., Livache, T., Canva, M., Levy, Y. et Soussi, T. (2004). **"Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction."** Oncogene **23**(32): 5543-50.

Mameza, M. G., Lockard, J. M., Zamora, E., Hillefors, M., Lavina, Z. S. et Kaplan, B. B. (2007). **"Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions."** J Neurochem **103**(3): 927-41.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). **"The nuclear receptor superfamily: the second decade."** Cell **83**(6): 835-839.

Mannelli, I., Lecerf, L., Guerrouache, M., Goossens, M., Millot, M. C. et Canva, M. (2007). **"DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems."** Biosens Bioelectron **22**(6): 803-9.

Mansuy-Schlick, V., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. et Boireau, W. (2006). **"Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements."** Biosens Bioelectron **21**(9): 1830-7.

Mansuy, V., Boireau, W., Fraichard, A., Schlick, J. L., Jouvenot, M. et Delage-Mourroux, R. (2004). **"GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor."** Biochem Biophys Res Commun **325**(2): 639-48.

Margueron, R., Duong, V., Castet, A. et Cavailles, V. (2004). **"Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells."** Biochem Pharmacol **68**(6): 1239-46.

Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H. et Gurbide, E. (1993). **"In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens."** J Steroid Biochem Mol Biol **45**(5): 399-405.

Martin, L. A., Farmer, I., Johnston, S. R., Ali, S., Marshall, C. et Dowsett, M. (2003). **"Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation."** J Biol Chem **278**(33): 30458-68.

Martino, S., Cauley, J. A., Barrett-Connor, E., Powles, T. J., Mershon, J., Disch, D., Secrest, R. J. et Cummings, S. R. (2004a). **"Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene."** J Natl Cancer Inst **96**(23): 1751-61.

Martino, S., Costantino, J., McNabb, M., Mershon, J., Bryant, K., Powles, T. et Secrest, R. J. (2004b). **"The role of selective estrogen receptor modulators in the prevention of breast cancer: comparison of the clinical trials."** Oncologist **9**(2): 116-25.

Massart, F., Meucci, V., Saggese, G. et Soldani, G. (2008). **"High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins."** J Pediatr **152**(5): 690-5, 695 e1.

McCormack, P. et Sapunar, F. (2008). **"Pharmacokinetic profile of the fulvestrant loading dose regimen in postmenopausal women with hormone receptor-positive advanced breast cancer."** Clin Breast Cancer **8**(4): 347-51.

McDonnell, D. P., Clemm, D. L., Hermann, T., Goldman, M. E. et Pike, J. W. (1995). **"Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens."** Mol Endocrinol **9**(6): 659-69.

McEwan, I. J. (2004). **"Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily."** Essays Biochem **40**: 1-10.

McEwen, B. S. (2001). **"Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms."** J Appl Physiol **91**(6): 2785-801.

McEwen, B. S. et Alves, S. E. (1999). **"Estrogen actions in the central nervous system."** Endocr Rev **20**(3): 279-307.

McInerney, E. M. et Katzenellenbogen, B. S. (1996). **"Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation."** J Biol Chem **271**(39): 24172-8.

McInerney, E. M., Weis, K. E., Sun, J., Mosselman, S. et Katzenellenbogen, B. S. (1998). **"Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras."** Endocrinology **139**(11): 4513-22.

Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O. et Flouriot, G. (2004). **"The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell."** J Biol Chem **279**(25): 26184-91.

Metzger, D., White, J. H. et Chambon, P. (1988). **"The human oestrogen receptor functions in yeast."** Nature **334**(6177): 31-6.

Miao, S., Gao, Z., Kou, Z., Xu, G., Su, C. et Liu, N. (2008). **"Influence of bisphenol a on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: a two-generational study."** J Toxicol Environ Health A **71**(15): 1000-8.

Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M. et Auricchio, F. (1998). **"Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor."** Embo J **17**(7): 2008-18.

Miller, C. P., Collini, M. D. et Harris, H. A. (2003). **"Constrained phytoestrogens and analogues as ERbeta selective ligands."** Bioorg Med Chem Lett **13**(14): 2399-403.

Mohammad, R. M., Al-Katib, A., Aboukameel, A., Doerge, D. R., Sarkar, F. et Kucuk, O. (2003). **"Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy."** Mol Cancer Ther **2**(12): 1361-1368.

Mohrluder, J., Hoffmann, Y., Stangler, T., Hanel, K. et Willbold, D. (2007). **"Identification of clathrin heavy chain as a direct interaction partner for the gamma-aminobutyric acid type A receptor associated protein."** Biochemistry **46**(50): 14537-43.

Montano, M. M., Muller, V., Trobaugh, A. et Katzenellenbogen, B. S. (1995). **"The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists."** Mol Endocrinol **9**(7): 814-25.

Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliewer, S. A., Lehmann, J. M. et Willson, T. M. (1998). **"Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms."** Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 75-8.

Morrow, M. et Jordan, V. C. (2000). **"Tamoxifen to prevent breast cancer."** Adv Surg **34**: 287-99.

Mosselman, S., Polman, J. et Dijkema, R. (1996). **"ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor."** FEBS Lett **392**(1): 49-53.

Mrksich, M. et Whitesides, G. M. (1996). **"Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells."** Annu Rev Biophys Biomol Struct **25**: 55-78.

Muramatsu, M. et Inoue, S. (2000). **"Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?"** Biochem Biophys Res Commun **270**(1): 1-10.

Nathorst-Boos, J. et Hammar, M. (1997). **"Effect on sexual life--a comparison between tibolone and a continuous estradiol-norethisterone acetate regimen."** Maturitas **26**(1): 15-20.

Nedelkov, D. et Nelson, R. W. (2001). **"Analysis of human urine protein biomarkers via biomolecular interaction analysis mass spectrometry."** Am J Kidney Dis **38**(3): 481-7.

Nelson, R. W., Jarvik, J. W., Taillon, B. E. et Tubbs, K. A. (1999). **"BIA/MS of epitope-tagged peptides directly from E. coli lysate: multiplex detection and protein identification at low-femtomole to subfemtomole levels."** Anal Chem **71**(14): 2858-65.

Nelson, R. W. et Krone, J. R. (1999). **"Advances in surface plasmon resonance biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS)."** J Mol Recognit **12**(2): 77-93.

Nemos, C., Mansuy, V., Vernier-Magnin, S., Fraichard, A., Jouvenot, M. et Delage-Mourroux, R. (2003). **"Expression of gec1/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of gec1/GABARAPL1 in the central nervous system."** Brain Res Mol Brain Res **119**(2): 216-9.

Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hamalainen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F. et Pluckthun, A. (1997). **"BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip."** Anal Biochem **252**(2): 217-28.

Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. et Gustafsson, J. A. (2001). **"Mechanisms of estrogen action."** Physiol Rev **81**(4): 1535-65.

Nonnenmacher, L. (2003). **"Informations about reagents: androstenedione dihydrotestosterone, estriol and estrone."** Immuno-analyse & Biologie spécialisée **18**(3): 166-171.

Nuzzo, R. G. et Allara, D. L. (1983). **"Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces."** J. Am. Chem. Soc. **105**: 4481-4483.

Nymann-Andersen, J., Wang, H. et Olsen, R. W. (2002). **"Biochemical identification of the binding domain in the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) mediating dimer formation."** Neuropharmacology **43**(4): 476-81.

O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K. et Hansen, U. (2004). **"Genomic targets of nuclear estrogen receptors."** Mol Endocrinol **18**(8): 1859-75.

O'Malley, B. W. (2005). **"A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action."** Mol Endocrinol **19**(6): 1402-11.

Obremski, K., Gajecki, M., Zwierzchowski, W., Zielonka, L., Otrrocka-Domagala, I., Rotkiewicz, T., Mikołajczyk, A., Gajecka, M. et Polak, M. (2003). **"Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts."** Pol J Vet Sci **6**(4): 239-45.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. et Muramatsu, M. (1998). **"The complete primary structure of human estrogen receptor**

beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro." Biochem Biophys Res Commun 243(1): 122-6.

Okazaki, N., Yan, J., Yuasa, S., Ueno, T., Kominami, E., Masuho, Y., Koga, H. et Muramatsu, M. (2000). **"Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation."** Brain Res Mol Brain Res 85(1-2): 1-12.

Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K. et Kano, I. (2001). **"ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR."** Food Chem Toxicol 39(12): 1225-32.

Onate, S. A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T. E., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Edwards, D. P. et O'Malley, B. W. (1998). **"The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors."** J Biol Chem 273(20): 12101-8.

Otto, A. (1968). **"Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection."** Z. Phys. 216: 398-410.

Oxelmark, E., Knoblauch, R., Arnal, S., Su, L. F., Schapira, M. et Garabedian, M. J. (2003). **"Genetic dissection of p23, an Hsp90 cochaperone, reveals a distinct surface involved in estrogen receptor signaling."** J Biol Chem 278(38): 36547-55.

Palmlund, I., Apfel, R., Buitendijk, S., Cabau, A. et Forsberg, J. G. (1993). **"Effects of diethylstilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th international congress of ISPOG."** J Psychosom Obstet Gynaecol 14(1): 71-89.

Park, T., Choo, J., Lee, M., Kim, Y. S., Lee, E. K. et Lee, H. S. (2004). **"Enhancement of the protein loading density by a pre-cleaning process of a gold substrate: confocal laser scanning microscopic study."** Anal Sci 20(9): 1255-8.

Parker, M. G. (1993). **"Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action."** Breast Cancer Res Treat 26(2): 131-7.

Pasqualini, J. R. (2004). **"The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review."** Biochim Biophys Acta 1654(2): 123-43.

Peh, W. Y., Reimhult, E., Teh, H. F., Thomsen, J. S. et Su, X. (2007). **"Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor alpha-DNA complexes: a combinational quartz crystal microbalance with dissipation and surface plasmon resonance study."** Biophys J 92(12): 4415-4423.

Pellerin, I., Vuillermoz, C., Jouvenot, M., Ordener, C., Royez, M. et Adessi, G. L. (1993). **"Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells."** Mol Cell Endocrinol 90(2): R17-21.

Pieralli, C., Attoui, C., Boireau, W. et Wacogne, B. (2009). **"Low Cost Optical Detection of DNA Hybridization on Biochips."** Laser Physics in press.

Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J. A. et Carlquist, M. (1999). **"Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist."** Embo J **18**(17): 4608-18.

Pillon, A., Boussioux, A. M., Escande, A., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M. J., Casellas, C., Nicolas, J. C. et Balaguer, P. (2005). **"Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: application to environmental analysis."** Environ Health Perspect **113**(3): 278-284.

Pink, J. J. et Jordan, V. C. (1996). **"Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines."** Cancer Res **56**(10): 2321-30.

Pitt, J. I. (2000). **"Toxicogenic fungi and mycotoxins."** Br Med Bull **56**(1): 184-92.

Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M. et Garcia, M. (2004). **"Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion."** Crit Rev Oncol Hematol **51**(1): 55-67.

Porter, W., Saville, B., Hoivik, D. et Safe, S. (1997). **"Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor."** Mol Endocrinol **11**(11): 1569-80.

Power, K. A. et Thompson, L. U. (2003). **"Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation."** Breast Cancer Res Treat **81**(3): 209-21.

Prime, K. et Whitesides, G. (1991). **"Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces."** Science **252**(5009): 1164-1167.

Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppala, E. et Wahala, K. (2002). **"Enterolignans."** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **777**(1-2): 29-43.

Rasmussen, T. H. et Nielsen, J. B. (2002). **"Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen)."** Biomarkers **7**(4): 322-36.

Ratajczak, T. (2001). **"Protein coregulators that mediate estrogen receptor function."** Reprod Fertil Dev **13**(4): 221-9.

Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L. et Levin, E. R. (1999). **"Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells."** Mol Endocrinol **13**(2): 307-19.

Razandi, M., Pedram, A. et Levin, E. R. (2000). **"Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer."** Mol Endocrinol **14**(9): 1434-47.

Rella, R., Spadavecchia, J., Manera, M. G., Siciliano, P., Santino, A. et Mita, G. (2004). **"Liquid phase SPR imaging experiments for biosensors applications."** Biosens Bioelectron **20**(6): 1140-8.

Rich, R. L. et Myszka, D. G. (2000). **"Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis."** Curr Opin Biotechnol **11**(1): 54-61.

Rories, C. et Spelsberg, T. C. (1989). **"Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models."** Annu Rev Physiol **51**: 653-81.

Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M. et Ockene, J. (2002). **"Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial."** Jama **288**(3): 321-333.

Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., de Gaetano, G., Evangelista, V. et Cerletti, C. (1998). **"Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function."** Br J Pharmacol **123**(8): 1691-9.

Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J. M. et Moras, D. (2000). **"Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors."** Breast Cancer Res **2**(5): 353-9.

Ruiz-Taylor, L. A., Martin, T. L., Zaugg, F. G., Witte, K., Indermuhle, P., Nock, S. et Wagner, P. (2001). **"Monolayers of derivatized poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces."** Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 852-7.

Ryu, D., Jackson, L. S. et Bullerman, L. B. (2002). **"Effects of processing on zearalenone."** Adv Exp Med Biol **504**: 205-16.

Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J. et Redeuilh, G. (1999). **"Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element."** Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11217-22.

Sadana, A. (2001). **"A kinetic study of analyte-receptor binding and dissociation, and dissociation alone, for biosensor applications: a fractal analysis."** Anal Biochem **291**(1): 34-47.

Saim, M., Cote, J. F., Morel, O., Malartic, C., Akerman, G., Gray, F. et Barranger, E. (2008). **"[Malignant mixed mullerian tumor of the uterus following tamoxifen for breast cancer: case report]."** Gynecol Obstet Fertil **36**(2): 166-8.

Saji, S. et Kuroi, K. (2008). **"Application of selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment according to their intrinsic nature."** Breast Cancer.

Satomi, T., Nagasaki, Y., Kobayashi, H., Tateishi, T., Kataoka, K. et Otsuka, H. (2007). **"Physicochemical characterization of densely packed poly(ethylene glycol) layer for minimizing nonspecific protein adsorption."** J Nanosci Nanotechnol **7**(7): 2394-9.

Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R. et Steinbiss, H. H. (1995). **"Improved high-level expression system for eukaryotic genes in Escherichia coli using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs."** Biotechniques **19**(2): 196-8, 200.

Schuck, P. (1996). **"Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport."** Biophys J **70**(3): 1230-49.

Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M. C. et Corbo, L. (2005). **"Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity."** Mol Endocrinol **19**(11): 2671-84.

Sesay, A. M. et Cullen, D. C. (2001). **"Detection of hormone mimics in water using a miniturised SPR sensor."** Environ Monit Assess **70**(1-2): 83-92.

Shao, W., Halachmi, S. et Brown, M. (2002). **"ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator."** Mol Cell Biol **22**(10): 3358-72.

Sheppard, H. M., Matsuda, S., Harries, J. C., Kindle, K. B. et Heery, D. M. (2003). **"Transcriptional activation by estrogen receptor (ERalpha) and steroid receptor coactivator (SRC1) involves distinct mechanisms in yeast and mammalian cells."** J Mol Endocrinol **30**(3): 411-22.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. et Greene, G. L. (1998). **"The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen."** Cell **95**(7): 927-37.

Shriver-Lake, L. C., Donner, B., Edelstein, R., Breslin, K., Bhatia, S. K. et Ligler, F. S. (1997). **"Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers."** Biosens Bioelectron **12**(11): 1101-6.

Shughrue, P. J., Lane, M. V. et Merchenthaler, I. (1997). **"Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system."** J Comp Neurol **388**(4): 507-25.

Sigal, G. B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J. et Whitesides, G. M. (1996). **"A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance."** Anal Chem **68**(3): 490-7.

Sigal, G. B., Mrksich, M. et Whitesides, G. M. (1997). **"Using Surface Plasmon Resonance spectroscopy to measure the association of detergents with self-assembled monolayers of hexadecanethiolate on gold."** Langmuir **13**: 2749-2755.

Silin, V. V., Weetall, H. et Vanderah, D. J. (1997). **"SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs)."** J Colloid Interface Sci **185**(1): 94-103.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W. et Liao, J. K. (2000). **"Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase."** Nature **407**(6803): 538-41.

Snopok, B., Yurchenko, M., Szekely, L., Klein, G. et Kashuba, E. (2006). **"SPR-based immunocapture approach to creating an interfacial sensing architecture: Mapping of the MRS18-2 binding site on retinoblastoma protein."** Anal Bioanal Chem **386**(7-8): 2063-73.

Song, R. X., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R. et Santen, R. J. (2002). **"Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation."** Mol Endocrinol **16**(1): 116-27.

Soto, A. M., Vandenberg, L. N., Maffini, M. V. et Sonnenschein, C. (2008). **"Does breast cancer start in the womb?"** Basic Clin Pharmacol Toxicol **102**(2): 125-33.

Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. et Brennan, M. (1973). **"A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma."** J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-16.

Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. et Urbaniczky, C. (1991). **"Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins."** J Colloid Inter Sci **143**(2): 513-526.

Su, X., Lin, C. Y., O'Shea, S. J., Teh, H. F., Peh, W. Y. et Thomsen, J. S. (2006). **"Combinational application of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance for studying nuclear hormone receptor-response element interactions."** Anal Chem **78**(15): 5552-5558.

Sugawara, T., Nomura, E., Nakajima, A. et Sakuragi, N. (2004). **"Characterization of binding between SF-1 and Sp1: predominant interaction of SF-1 with the N-terminal region of Sp1."** J Endocrinol Invest **27**(2): 133-41.

Teh, H. F., Peh, W. Y., Su, X. et Thomsen, J. S. (2007). **"Characterization of protein--DNA interactions using surface plasmon resonance spectroscopy with various assay schemes."** Biochemistry **46**(8): 2127-2135.

Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F. et Chalbos, D. (2001). **"Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins."** J Biol Chem **276**(39): 36361-9.

Thompson, L. U. (1998). **"Experimental studies on lignans and cancer."** Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**(4): 691-705.

Tiemann, U. (2008). **"In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review."** Reprod Toxicol **25**(3): 316-26.

Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). **"Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications."** Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Umayahara, Y., Ji, C., Centrella, M., Rotwein, P. et McCarthy, T. L. (1997). **"CCAAT/enhancer-binding protein delta activates insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone."** J Biol Chem **272**(50): 31793-800.

Valesia, A., Colpo, P., Meziani, T., Lisboa, P., Lejeune, M. et Rossi, F. (2006). **"Immobilization of antibodies on biosensing devices by nanoarrayed self-assembled monolayers."** Langmuir **22**(4): 1763-7.

van Hoorn, W. P. (2002). **"Identification of a second binding site in the estrogen receptor."** J Med Chem **45**(3): 584-9.

van Meeuwen, J. A., Korthagen, N., de Jong, P. C., Piersma, A. H. et van den Berg, M. (2007). **"(Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture."** Toxicol Appl Pharmacol **221**(3): 372-83.

Vanparys, C., Maras, M., Lenjou, M., Robbens, J., Van Bockstaele, D., Blust, R. et De Coen, W. (2006). **"Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells."** Toxicol In Vitro **20**(7): 1238-48.

Verheus, M., van Gils, C. H., Keinan-Boker, L., Grace, P. B., Bingham, S. A. et Peeters, P. H. (2007). **"Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk."** J Clin Oncol **25**(6): 648-55.

Vernier-Magnin, S., Muller, S., Sallot, M., Radom, J., Musard, J. F., Adami, P., Dulieu, P., Remy-Martin, J. P., Jouvenot, M. et Fraichard, A. (2001). **"A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP."** Biochem Biophys Res Commun **284**(1): 118-25.

Vernier-Magnin, S., Nemos, C., Mansuy, V., Tolle, F., Guichard, L., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. et Fraichard, A. (2005). **"Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1*/GABARAPL1 gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon."** Biochim Biophys Acta **1731**(1): 23-31.

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. et al. (1985). **"Cloning of the human estrogen receptor cDNA."** Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7889-93.

Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J. et Olsen, R. W. (1999). **"GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton."** Nature **397**(6714): 69-72.

Wang, H. et Olsen, R. W. (2000). **"Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction."** J Neurochem **75**(2): 644-55.

Wang, H., Peters, G. A., Zeng, X., Tang, M., Ip, W. et Khan, S. A. (1995). **"Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerization is ligand-dependent in vivo."** J Biol Chem **270**(40): 23322-9.

Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y. et Wu, J. M. (2002). **"Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro."** Int J Mol Med **9**(1): 77-9.

Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M. P., Chen, D., Huang, S. M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Stallcup, M. R. et Kushner, P. J. (1998). **"Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins."** Mol Endocrinol **12**(10): 1605-18.

Wise, P. M., Dubal, D. B., Wilson, M. E., Rau, S. W. et Liu, Y. (2001). **"Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain."** Front Neuroendocrinol **22**(1): 33-66.

Wood, J. R., Likhite, V. S., Loven, M. A. et Nardulli, A. M. (2001). **"Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements."** Mol Endocrinol **15**(7): 1114-26.

Wu, L., Einstein, M., Geissler, W. M., Chan, H. K., Elliston, K. O. et Andersson, S. (1993). **"Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity."** J Biol Chem **268**(17): 12964-9.

Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. et Gronemeyer, H. (1996). **"A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors."** Nat Struct Biol **3**(1): 87-94.

Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1998). **"Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene."** Science **279**(5358): 1922-5.

Yang, J., Singleton, D. W., Shaughnessy, E. A. et Khan, S. A. (2008). **"The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization."** Mol Cell Endocrinol.

Yang, N., Su, X., Tjong, V. et Knoll, W. (2007). **"Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein-DNA binding."** Biosens Bioelectron **22**(11): 2700-2706.

Yarmush, M. L., Patankar, D. B. et Yarmush, D. M. (1996). **"An analysis of transport resistances in the operation of BIAcore; implications for kinetic studies of biospecific interactions."** Mol Immunol **33**(15): 1203-14.

Ye, S. F., Saga, I., Ichimura, K., Nagai, T., Shinoda, M. et Matsuzaki, S. (2003). **"Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats."** Endocr Regul **37**(3): 145-52.

Yi, P., Driscoll, M. D., Huang, J., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R. A. et Muyan, M. (2002). **"The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta."** Mol Endocrinol **16**(4): 674-93.

Yin, G. G., Kookana, R. S. et Ru, Y. J. (2002). **"Occurrence and fate of hormone steroids in the environment."** Environ Int **28**(6): 545-51.

Yuan, L., Wagatsuma, C., Yoshida, M., Miura, T., Mukoda, T., Fujii, H., Sun, B., Kim, J. H. et Surh, Y. J. (2003). **"Inhibition of human breast cancer growth by GCP (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by beta-glucuronidase from tumor tissues."** Mutat Res **523-524**: 55-62.

Yuwai, K. E., Rao, K. S., Singh, K., Tanaka, T. et Ueno, Y. (1994). **"Occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea."** Nat Toxins **2**(1): 19-21.

Zacharewski, T. (1998). **"Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays."** Environ Health Perspect **106 Suppl 2**: 577-82.

Zhang, Z. et Hu, J. (2008). **"Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)."** J Environ Sci (China) **20**(3): 347-52.

ANNEXES

1. Publication numéro III :

Ces travaux ont permis de mettre en place une méthode de conception de biocapteur or/silice à faible coût. L'originalité repose sur le dépôt d'un film mince de SiOx par PECVD sur un film métallique d'une puce SPR. Les conditions contrôlées de dépôts en épaisseur permettent de maintenir un phénomène de résonance plasmon dans le cadre de lecture de l'instrumentation Biacore. Une telle puce ouvre ainsi la possibilité de proposer une nouvelle interface compatible avec la chimie des silanes habituellement employée sur lames de verre.

D'autre part une telle architecture de films minces permet de réduire considérablement le phénomène d'extinction de fluorescence (« quenching ») résultant de la proximité d'une surface métallique. Cette surface est constituée d'une fine couche de chrome de 2 nm, permettant l'accroche d'un film d'or de 40 nm recouvert d'une couche de silice (SiOx). Une fois mise en place, cette surface a été caractérisée par AFM, puis fonctionnalisée par de l'octadécyltrichlorosilane. Cette étape rend la surface hydrophobe et permet la formation d'une monocouche phospholipidique par fusion de liposomes. L'environnement biomimétique crée est compatible avec l'immobilisation de molécules biologiques (ADN et/ou protéines). Enfin, la réduction du phénomène d'extinction de fluorescence par cette surface a été montrée à l'aide de sondes couplées à une cyanine (CY5). Cette étude préliminaire ouvre la voie à la mise en place de biocapteurs à faible coût et à haute sensibilité compatibles avec les techniques de « Surface Plasmon Coupled Emission » (SPCE).

Ma contribution à ce travail a été la mise en place de la monocouche phospholipidique à la surface de ce biocapteur or/silice.

Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching.

Mangeat T., Berthier A., Elie-Caille C., Perrin M., Boireau W., Pieralli C. et Wacogne B.

Laser Physics (2009, vol 2, sous presse).

Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

Thomas Mangeat¹, Alexandre Berthier², Céline Elie-Caille², Maud Perrin², Wilfrid Boireau^{2#}, Christian Pieralli¹ and Bruno Wacogne¹

¹ Optics Department, FEMTO-ST Institute, UFR ST, 16, route de Gray, F-25030 Besançon cedex, France

² Clinical-Innovation Proteomic Platform, FEMTO-ST Institute, 32, avenue de l'Observatoire, F-25044 Besançon cedex, France

Abstract: We report Gold/Silica biochips for low cost biosensor devices. Firstly, the study of biochemical interactions on silica by means of Surface Plasmon Resonance (SPR) is presented. Secondly, Gold/Silica biochips are employed to reduce the strong quenching that occurs when a fluorophore is close to the gold surface. Furthermore, the control of the Silica-like thickness allows optimizing the distance between the metallic surface and the fluorophore in order to enhance the fluorescent signal. These results represent the first steps towards highly sensitive, specific and low cost biosensors based, for example, on Surface Plasmon Coupled Emission (SPCE) techniques.

To whom correspondence should be sent
Tel.: +33 3 81 85 39 59 Fax: +33 3 81 85 39 98 email: wboireau@femto-st.fr

1. Introduction

Over the past decade optical biosensors have been largely developed to study biomolecular interactions. The most important characteristics of biosensors are specificity and sensitivity. Specificity strongly depends on the biospecific interface of biosensors. Biorecognition processes and non-specific interactions depend on the (i) surface of material, (ii) chemical functionalization and (iii) biomolecular grafting. Sensitivity depends not only on the (bio)-functionalizations but also on the biosensor architecture and transduction elements. Nowadays, techniques based on Surface Plasmon Resonance (SPR) [1] are largely used because they present a high degree of sensitivity. In this case, local change in the refractive index inside the evanescent-field region of the plasmon mode shifts the resonance angle. An angular shift of approximately 1×10^{-4} degree corresponds typically to the adsorption of a biological film of about 100 pg/cm^2 [2, 3]. However, this technology comprises some limitations. It is well known that gold interfaces are subject to irreversible and degradative adsorption of proteins and require functionalization processes to prevent it [4]. Gold interface requires thiol-based self-assembly processes in order to build biomolecular architectures which could limit the variety of functionalization processes. We have also to consider that a wide range of development in the field of biochip deals with the construction of molecular architectures based on silane coupling chemistries on silicon dioxide substrates. Until recently, these developments cannot take benefit of the SPR investigations. Few studies have tried to overcome this problem by chemical treating the gold surface directly or by depositing thin silicon dioxide layers. Thus a stable silica film on noble metal has been generated by applying sol-gel chemistry process [5] or through physical approaches as electron-beam evaporation [6]. Surface plasmon resonance phenomenon is extremely dependent from variations of the refractive index of the medium above the gold surface changes in a cushion of about 100 nm thickness and shift in angle is relatively limited. For instance, development of Au/SiO_x chips compatible with SPR measurements requires a critical combination; namely controlling the deposition of films at a nanometer scale, their stability and reactivity while preserving the ability of the system to monitor further biomass transfer at the interface. In this way, remarkable works have been carried out recently dealing with the fabrication and characterization of stable thin film of amorphous silica deposited on SPR gold chip using the plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD) technique [7-8]. In these studies, only 10 nm of silicon dioxide was deposited onto gold surface without using an adhesion layer, leading to electrochemical surface plasmon resonance works with a commercial apparatus.

Such thin layer of SiO_x seems to be enough for a complete passivation of the gold layer and presents stable chemical and mechanical properties. We propose an alternative of the previous process devoted to the conception and realization of gold/SiO_x biochips compatible, in our case, with Biacore™ technology, the leader company in SPR biosensors. Afterward, the functionalization would be directly applied to simple silica substrates.

SPR is not the only method for studying biochemical interactions. A lot of optical techniques based on fluorescence [9], Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) [10], or Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) [11] are widely investigated. A very large panel of solutions already provides high specificity and sensitivity (classical fluorescent probes, two photon detection, nanosphere, etc). The new challenge in fluorescence detection is to enhance the fluorescence signal and to produce highly directional signals for new highly sensitive biosensors with high signal to noise ratio (optical nanoantenna [12], Surface Plasmon Coupled Emission (SPCE) [13, 14]). However, quenching usually greatly reduces the intensity of the fluorescence signal when the bio-interaction occurs on a metallic surface. Again, gold/silica chips would be extremely interesting because they would increase the distance between the fluorescent molecule and the metallic surface of the biosensor.

In this paper, we present the fabrication of gold/silica biochips that offer an alternative to the above mentioned drawbacks concerning SPR and fluorescence sensing. We fabricated 40 nm Au biochip coated with a PECVD silica-like films of various thicknesses at low temperature. In the next part of this paper we present the process used to fabricate the gold/silica biochips as well as some characterisations of the device. In part 3, we report a new opportunity to study biological phenomena on silica layers by means of classical SPR techniques. Here, we present results concerning the fusion of vesicles on a silica surface. Another aspect is presented in part 4 of the paper. It concerns experiments conducted in order to control the quenching that occurs in the vicinity of a metallic surface. The control of the silica-like thickness allows optimizing the distance between the metal and the fluorophore. This allows suppressing the quenching. It also leads to an enhancement of the fluorescence intensity. Early experimental results show an enhancement factor of 4 compared to what is obtained on pure silica. Then, the conclusion will draw our attention to some perspective to be given to this work.

2. Fabrication process of gold/silica thin film.

Fabrication process

At first, a 2 nm thick chromium layer is deposited on a SiO₂ wafer (diameter: 13 mm, thickness: 0,17 mm) with plasma sputtering technology to improve the adherence of gold to the substrate. The 40 nm thick Au layer is then sputtered on the top of the Cr layer. The deposition times and the argon flow pressure have been optimized to obtain the desired thickness. Deposition times of Cr and Au layer are respectively 3 and 22 sec. Argon flow pressure and current intensity are respectively 7 μbar and 0.3 A. With these parameters, the deposition rates of the Au and Cr layers are respectively equal to 109 nm/min and 60 nm/min. Secondly, thin film au silica like layer is deposited on the top of Au layer with Plasma Enhanced Chemical Vaporization Deposition (PECVD) according the following conditions: temperature 24°C; gaz mixture SiH₄, N₂O and Arg with the respectively gaz flow 13, 51 and 35 sccm; total pressure in the reactor 0.13mBar and power 54 w at 150kHz. The deposition rate is about 660 Å/min with these experimental conditions. The thickness was controlled by the deposition duration.

Characterization of Gold/silica thin film: roughness and SPR response.

First of all, we tried to estimate the stoichiometry of the silica-like films. An X Photoelectron Spectroscopy has been used and we deduce the following composition of the thin films: SiON_{0.5}C_{0.05}. This composition led us to call our thin films "silica-like". At present, the presence of carbon is not understood. Concerning the complex refractive index of the films, first attempts with ellipsometry are not really conclusive. However, we think that the real part of the refractive index is about 2. Up to now, we have no idea of the value of the imaginary index.

The surface roughness has been analysis with AFM techniques. The AFM used was a Nanoscope III (Veeco, Santa Barbara, CA). Imaging was performed in contact mode using NPS-oxide sharpened silicon nitride probes (Veeco). The surface topography of a 40 nm thick gold thin film and a gold/Silica thin film surface is presented in figure 1. The thickness of the silica film is approximately 10 nm. AFM images demonstrate that gold chips present a rough surface, characterized by globular gold particles with diameters of about 30 nm. Nevertheless, while the gold surface is represented by globular particles, these particles are densely packed and the section profile presents a relatively flat topography, with only 1 to 1.5 nm maximum variation in height. Moreover, the roughness calculated on 1 μm² gives value of 0.27 nm, confirming this apparent surface homogeneity. For the Gold/silica biochip, the presence of the

silica thin film decreases the size of the globular particle (around 20 nm) and increases the surface roughness (0.7 nm for a 1 μm^2 scan).

However, a minimal surface roughness is useful to generate plasmon resonance, which is highly dependent on gold surface topography. Therefore, we have tested the SPR response of gold chips (40 nm) without silica. Experiments have been conducted with a Biacore[™] 2000 system for which the value of the reflection angle is given in terms of pixels on the CCD sensor. Figure 2 shows the SPR for both commercial and home made chips. We conclude that despite a slight shift of the resonance, our gold chips exhibit a slightly better resonance quality factor than the commercial ones. The SPR response of the gold/silica biochips has been simulated and compared to the experimental records. Figure 3 shows the result. The comparison between theoretical and experimental results provide two important indications: firstly, the gold/silica SPR dip is clearly shifted compared to bare gold surfaces; secondly, the roughness increase due to silica thin film does not dramatically affect the quality factor of the SPR. In conclusion this biochip can now be used to study biochemical interaction on silica with conventional SPR equipment.

3. SPR lipidic interactions studied on Au/SiO_x biochip

Biacore[™] systems, based on SPR, are widely used to study biomolecular interactions on gold surfaces (Protein and DNA chips based on thiols chemistry as a first step of functionalization) [15]. As previously stated, the same investigation would be particularly attractive on silica to study biomolecular response on silica surfaces based on silanols chemistry. Fusion of lipid vesicles onto the functionalized silica surface has been studied by SPR. The goal is to obtain a lipidic hemi membrane conferring bio-mimetic properties to the biochip and being a versatile tool to study biomolecules/lipid interactions. These experiments are in line with works presently developed in our proteomic platform concerning new types of DNA biochips [16]. Figure 4 shows the SPR experimental results of the fusion of lipid vesicles onto a functionalized silica surface by octadecyltrichlorosilanes (OTS). On the top of the figure, the principle of lipidic vesicles fusion onto the silica surface is presented. The curve at the bottom shows a typical Biacore[™] response for such an interaction. The moment when the vesicles are introduced into the microfluidic chip is clearly visible. In fact, the curve represents the shift of SPR reflection angle due to the change of the refractive index of the liquid into which the vesicles are contained. This shift is given in terms of RU (it holds for: Response Unit). After the biochemical reaction is finished (time T_0+4000 seconds) a buffer is

used to wash the chip surface. In this way, only the lipidic layer reconstituted to OTS layer remains. At the end, a final response of 1500 RU indicates an efficient fusion of the vesicles onto the surface. This result clearly demonstrates that SPR can be used to monitor biochemical interactions on silica surfaces.

4. Fluorescence applications: enhancement of fluorescence signal and suppressing quenching

As mentioned above, silica thin films can be employed to reduce the strong quenching that occurs when a fluorophore is close to a metallic surface [17, 18]. Also, the control of the silica thickness allows optimizing the distance between the metallic surface and the fluorophore in order to enhance of the fluorescence signal [19]. These effects have been studied with our biochip, with Cy5 dye deposited by sedimentation on the top of gold/silica chips with several silica thicknesses.

Experimental setup

The experimental setup is described in Figure 5. To obtain a very good uniformity of CY5 coating, the fluorescent dye is deposited by sedimentation on the top of the gold/silica film. The same concentration of CY5 dye is deposited for several chips with the respective silica thicknesses equal to 10, 25, 50, 100 and 150nm. An Olympus IX71 fluorescence optical microscope is used to scan the silica/gold surface. The excitation is set to a mercury vapour lamp couple with a 630+20nm band pass filters. The detection is performed by means of a CCD camera (Sony-HR-XC50) with 670nm fluorescence band pass filters (CHROMA ET700/75M). Then, the average of grey level is computed from 20 images taken with each individual gold/silica chip.

Experiments results and discussion

The top of figure 6 shows the experimental fluorescence intensity (crosses) versus the silica thickness and theoretical modeling of quenching effect (line). The theory is a bit difficult to establish because the exact complex reflection coefficients of sputtered gold and PECVD silica are difficult to estimate. An analytical description of the quenching can be found in reference [20]. For description purposes we can say that the shape of the signal

versus silica thickness is due to three main phenomena. For very small silica thicknesses, the quenching is dominant. When the silica thickness increases, a coupling between the fluorescent dipoles and the metal occurs. It is responsible for the exaltation of the fluorescence signal (together with the natural reflection of the fluorescence light onto the metallic surface). It should be noted that this enhancement very likely depends on the nanometric topology of the metal. For thicker silica layers a Fabry-Pérot behaviour can be observed. The rapid decrease of the interference pattern is due to the reduced coherence length of the fluorescence light. Then, and as it can be seen on the bottom of the figure for very thick silica layers, the influence of the metal practically disappears. The asymptotic value corresponds to what would be observed if the Cy5 dye was deposited directly onto a pure silica surface. The ratio (asymptotic value)/(maximum) defines the enhancement factor. Theoretically, it is equal to 4.3.

Looking at the experimental results, it is clear that with silica thicknesses of 10 or 25 nm, the quenching dramatically reduces the fluorescence emission. The highest fluorescence signal is achieved for a silica thickness equal to 50 nm where the enhancement factor is almost maximal. In order to confirm the fluorescence enhancement, we have compared the fluorescence obtained with a gold/silica chip (50 nm thick silica) with what is observed with a microscope slide. The result is shown in figure 7. Here, 16 pictures have been taken (horizontal axis) at various locations on the chips. The vertical axis represents the average grey levels of the images. The lower data correspond to pure silica while the upper ones to gold/silica chip. The experimental enhancement factor is equal to 3.8. Note that this can be further improved by controlling the roughness of the gold surface (work is being performed).

5. Conclusion.

In this paper, we have presented a new gold/silica biochip for biosensors applications. Firstly, biochemical interactions on silica were controlled by means classical SPR Biacore™ system. We demonstrated the potential of this approach through the reconstitution of lipidic membrane models devoted to, for example, the study of protein/lipidic matrix interactions. Secondly, the control of the quenching and the enhancement of the fluorescence were demonstrated using these gold/silica biochips. For a silica layer thickness of 50 nm, an enhancement factor of 3.8 was achieved.

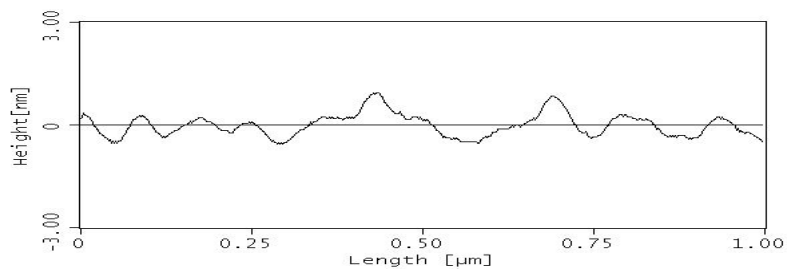
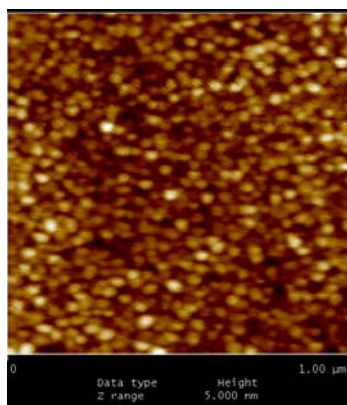
Current work is oriented toward two different applications. The influence of the surface roughness of the gold layer on the fluorescence enhancement is currently studied. This should lead to high sensitivity biosensors. At the same time, we are looking at the possibility of using our gold/silica chips in Surface Plasmon Coupled Emission (SPCE). It was proved in literature that SPCE could increase the fluorescence signal by a factor of up to 1000. In this technique, the high directionality of fluorescence emission may greatly improve the signal to noise ratio. Furthermore, the angular position of the SPCE emission peak is strongly wavelength dependent and it is possible to use SPCE as a spectrally resolving technique. In other words, this directional detection allows using different fluorophores at a same time without the use of additional dispersive elements. The idea behind is to fabricate a biosensor that can be used to detect several biochemical reactions simultaneously.

References

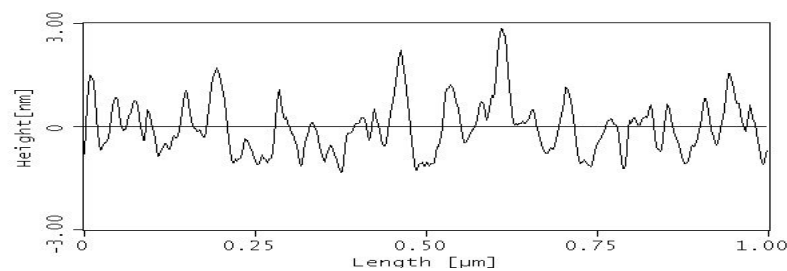
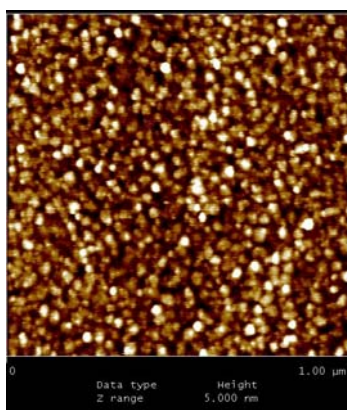
1. M. Rich R. L. and Myszka D. G., *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 54 (2000).
2. E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, *et al.* *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513 (1991).
3. W. D. Wilson, *Science* **295**, 2103 (2002).
4. J. E. Frew and H.A. Hill., *Eur J Biochem.* **172**, 261 (1988).
5. D. K. Kambhampati, T.A.M. Jakob, J.W. Robertson, *et al.* *Langmuir*, **17**, 1169 (2001).
6. H. B. Liao, W. Wena and G. K. L. Wong. *J. App. Phys.* **93** 4485 (2003).
7. S. Szunerits, R. Boukherroub, *Langmuir* **22**, 1660 (2006).
8. S. Szunerits, Y. Coffinier, S. Janel, *et al.*, *Langmuir* **22**, 10716 (2006).
9. W.C. Chan, D. Maxwell, X. Gao, *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 40 (2003).
10. I.L. Medintz, A.R. Clapp, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2**, 630 (2003).
11. D.A. Stuart, A.J. Haes, A.D. McFarland, *et al.*, in *Proceedings .SPIE, International Society of Optical Engineering 2004*, **5327**, pp. 60-73.
12. S. Kühn, U. Håkanson, L. Rogobete, *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 017402 (2006).
13. C. D. Geddes, I. Gryczynski, J. Malicka, *et al.* *J.Fluoresc.* **14**, 119 (2004).
14. G. Wintera and W. L. Barnes, *App.Phys.Lett.* **88**, 051109 (2006).
15. V. Mansuy-Schlick, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot, *et al.* *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1830 (2006).
16. W. Boireau, J.C. Zeeh, P.E. Puig P.E.,*et al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1631 (2005).
17. P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 113002 (2006).
18. G. Schneider, G. Decher, N. Neramourg, *et al.*, *Nano Lett.* **6**, 530 (2006).
19. J. Zhang and J. R. Lakowicz, *Opt. Express* **15**, 2598 (2007).
20. T. Pagnot, D. Barchiesi, D. Van Labeke, *et al.*, *Optics Letters*, **22**, 120 (1997).

Figure caption :

- Figure 1 : Atomic Force Microscopy of the thin films. Top gold only (rms = 0.3 nm). Bottom gold/silica film (rms = 0.7 nm).
- Figure 2 : Comparison between commercial gold chips and home made chips. Despite a shift of the resonance, our chips exhibit a better resonance quality factor.
- Figure 3 : SPR response of the gold/silica chips. Top: theoretical estimation. Bottom: experimental result.
- Figure 4 : SPR control of a biochemical interaction on a silica surface. Top: schematic representation of the reaction. Bottom: Typical Biacore® response.
- Figure 5 : Experimental set up used for fluorescence experiments.
- Figure 6 : Experimental and theoretical results of fluorescence quenching and enhancement. Top: comparison between experience and modelling. Bottom: factors of importance that explain the shape of the modelling. Theoretically an enhancement factor of 4.3 can be achieved.
- Figure 7 : Experimental results of fluorescence enhancement. Upper data: gold/silica chip. Lower data: pure silica microscope slide.



Gold : rms = 0.3 nm



Gold + 10 nm silica : rms = 0.7

Figure 1

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

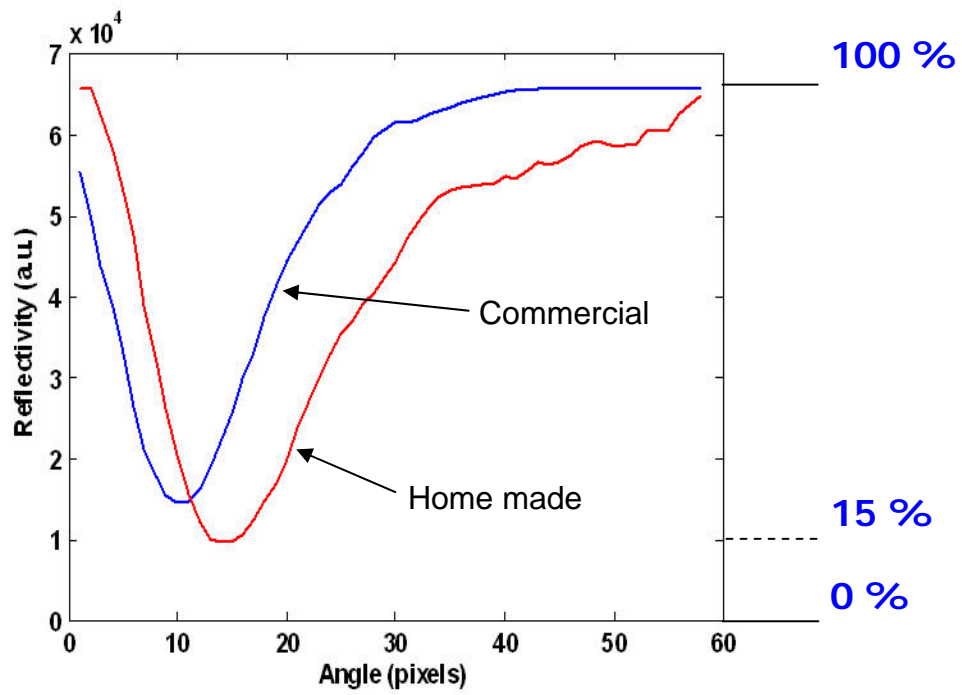


Figure 2

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

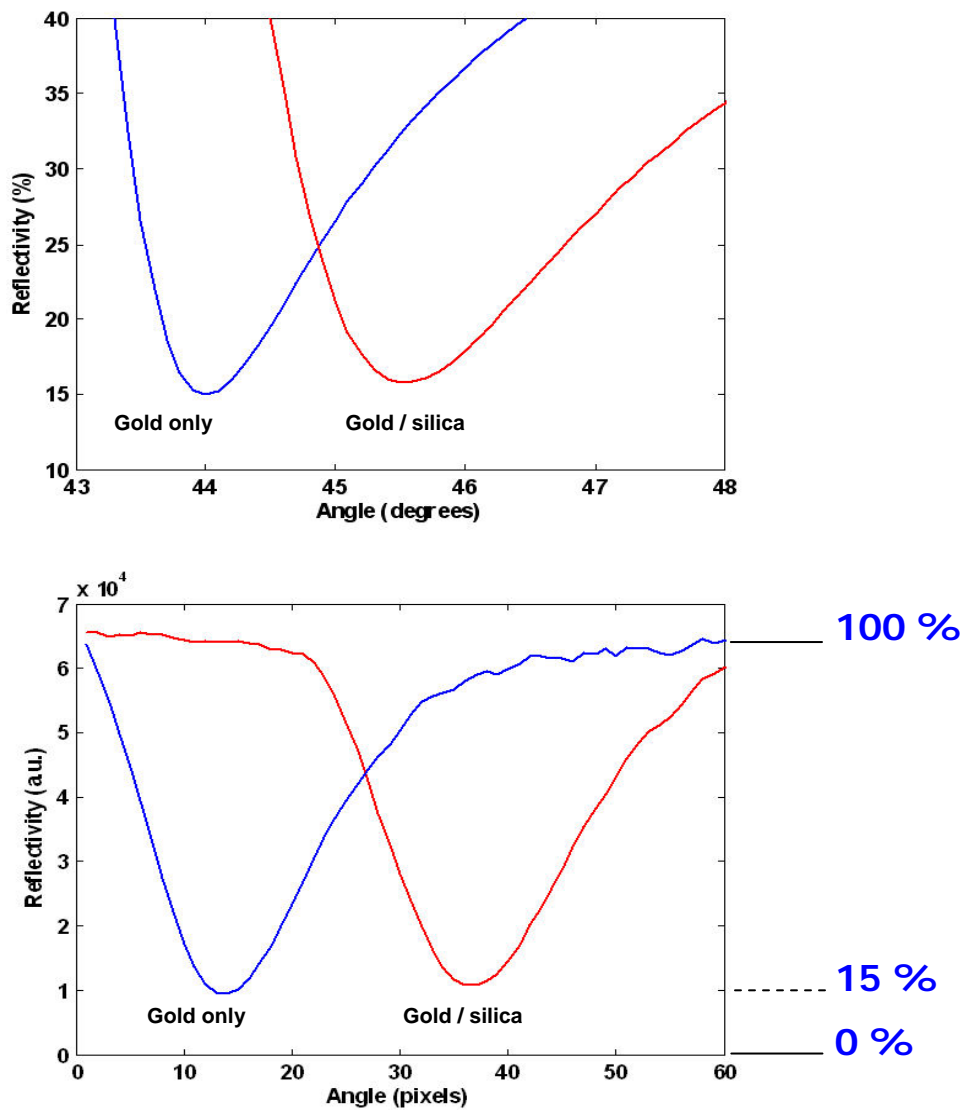


Figure 3

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

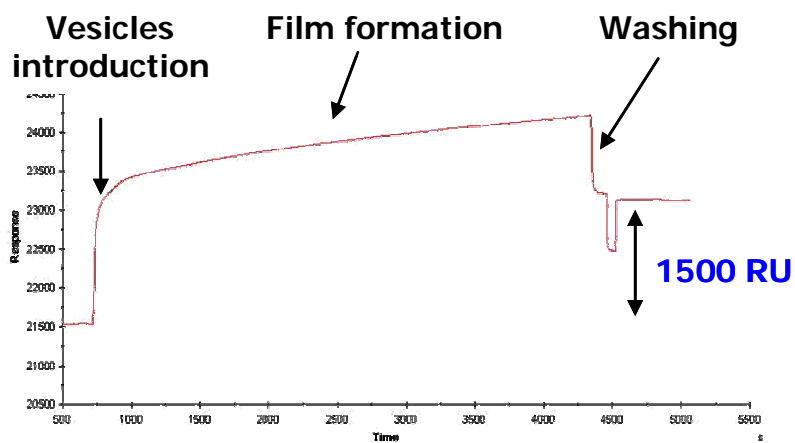
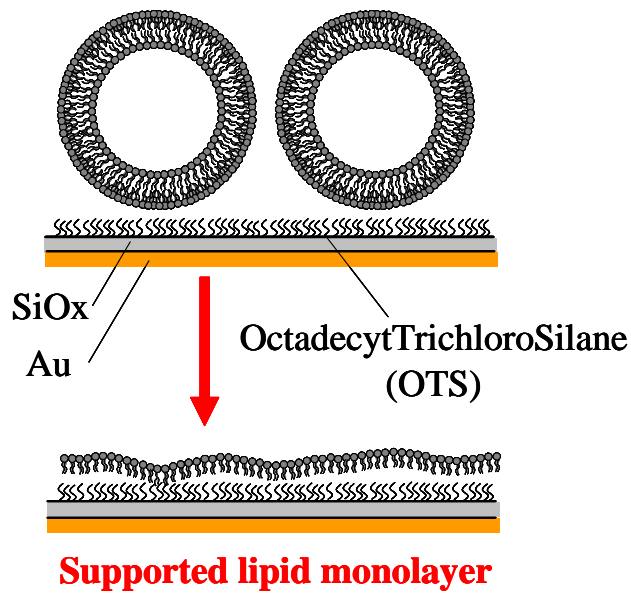


Figure 4

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

Experimental SETUP

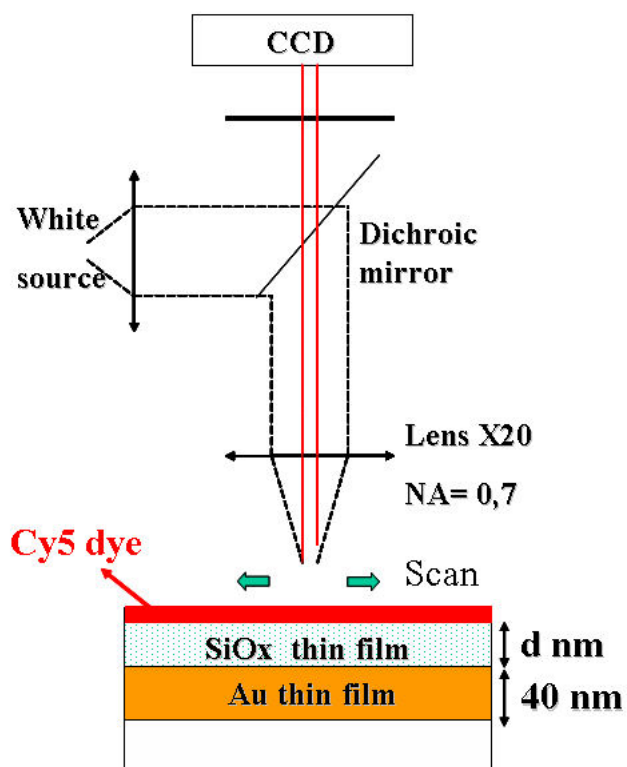


Figure 5

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

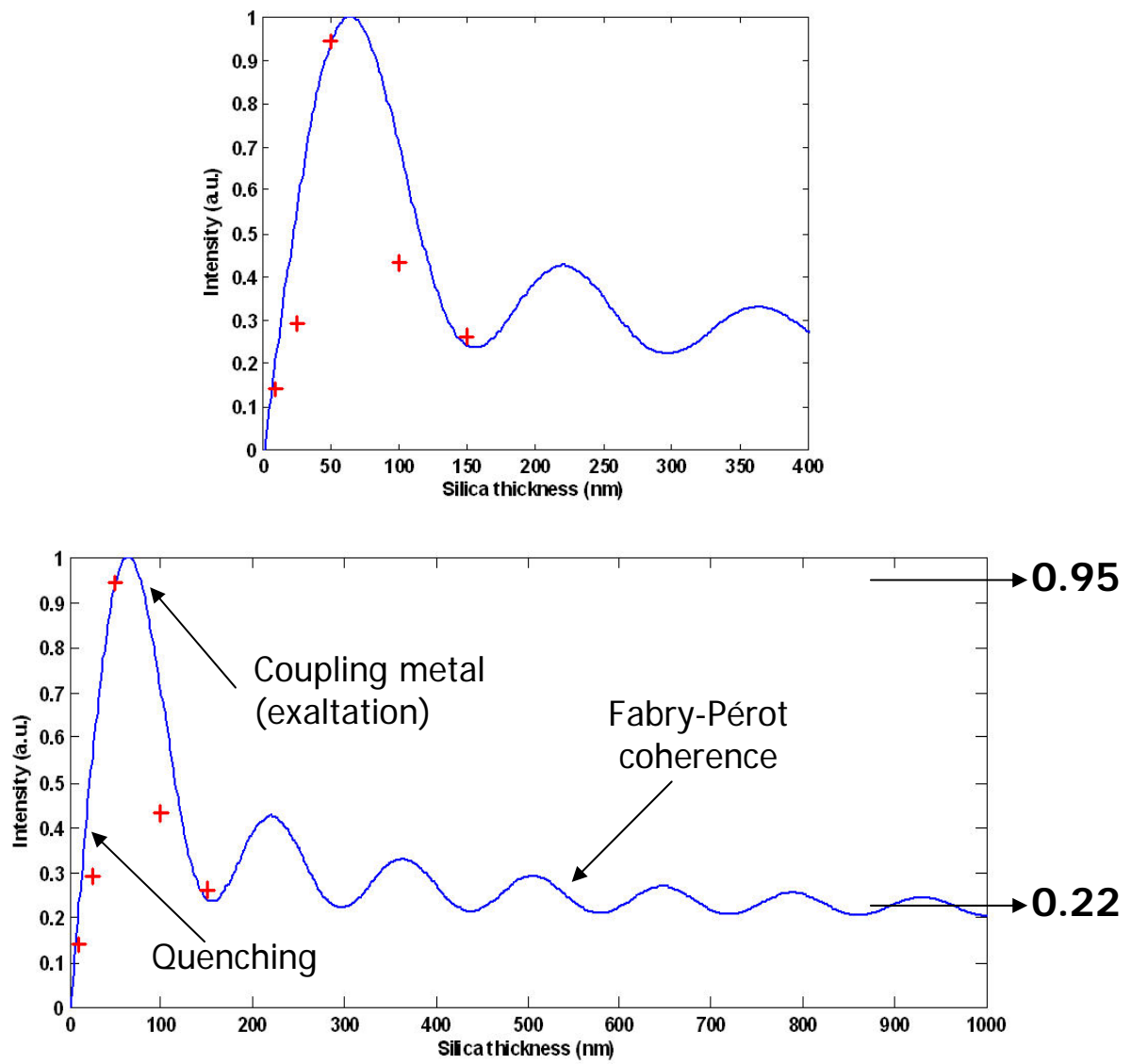


Figure 6

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

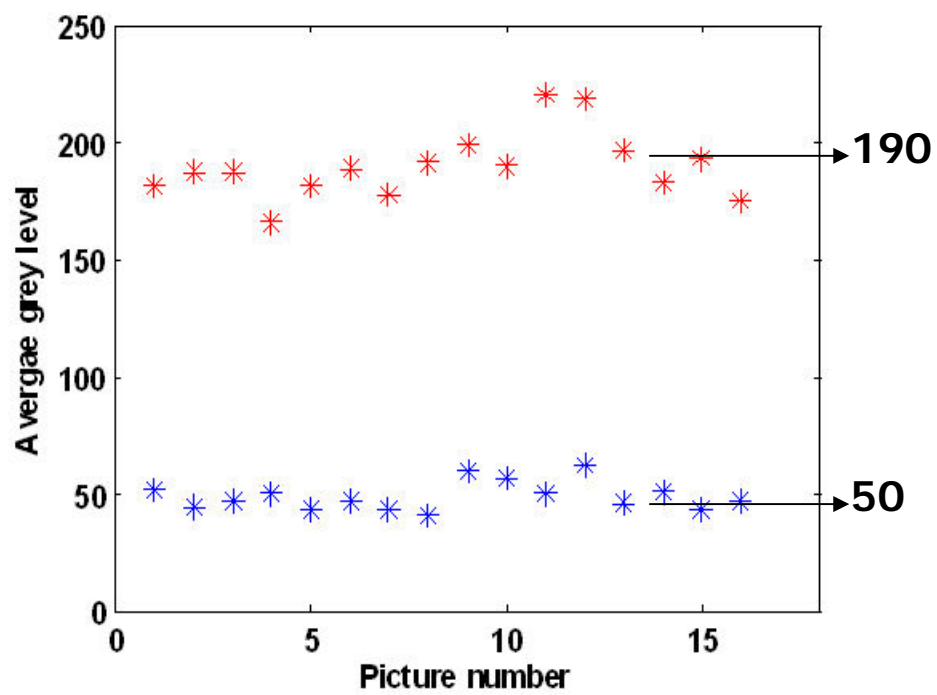


Figure 7

Mangeat - Gold/Silica biochips: applications to Surface Plasmon Resonance and fluorescence quenching

2. Liste des communications orales

- Berthier A., Girard C., Refouvelet B., Jouvenot M., Boireau W., Delage-Mourroux R. Nouveau concept de biocapteur ADN : application à l'étude de l'interaction du récepteur aux estrogènes (RE) avec l'ADN. Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM), Nantes, Octobre 2005.
- Elie-Caille C., Lesniewska E., Berthier A., Delage-Mourroux R., Boireau W. Concept of dynamic DNA network dedicated to DNA-Protein interactions studies. Congrès international : AFM-BioMed Conference Barcelona 2007, avril 2007.
- Berthier A., Elie-Caille C., Lesniewska E., Delage-Mourroux R., Boireau W. Conception, réalisation et caractérisation d'une biopuce dédiée à l'étude des interactions ADN/protéines. Forum des jeunes chercheurs (Besançon-Dijon). Dijon, Juin 2007.
- Berthier A., Elie-Caille C., Lesniewska E., Delage-Mourroux R., Boireau W. Caractérisation d'un biocapteur dédié à l'étude des interactions récepteur aux estrogènes / ADN. Société de Biologie de Besançon (SBB), Besançon, décembre 2007.

3. Liste des communications par affiche

- Berthier A., Jouvenot M., Delage-Mourroux R., Bourrillot E., Lesniewska E., Boireau W. Concept of dynamic DNA network dedicated to study DNA-Protein interactions. Nanobio-Europe. Grenoble, Juin 2006.
- Berthier A., Tolle F., Mansuy-Schlick V., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Jouvenot M. Effet de la surexpression de *gcl* sur le phénotype et le potentiel prolifératif de cellules de cancer du sein (MCF-7). Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). Clermont-ferrand septembre 2006.
- Berthier A., Girard C., Grandvullemin A., Muiyard F., Skaltsounis A.L., Jouvenot M. and Delage-Mourroux R. Effect of chrysin and 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin from *Podocytisus caramanicus* on ER α transactivation. THE XI INTERNATIONAL CONGRESS"PHYTOPHARM 2007". Leden, Hollande, Juin 2007.
- Berthier A., Girard C., Grandvullemin A., Muiyard F., Skaltsounis A.L., Jouvenot M. et Delage-Mourroux R. Recherche de nouvelles molécules pour le traitement de la ménopause. La cité des plantes, Besançon, avril 2007.

Concept of dynamic DNA network dedicated to study DNA-Protein interactions

Berthier A.¹, Jouvenot M.¹, Delage-Mourroux R.¹, Bourrillot E.², Lesniewska E.², Boireau W.³

1. Equipe E2SNC, EA3922, IFR 133, Université de Franche-Comté, Besançon, France

2. Laboratoire de Physique LPUB, UMR 5027 CNRS, Dijon, France

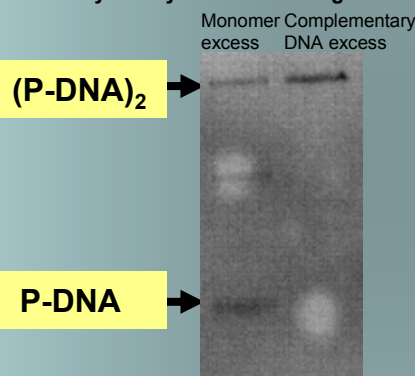
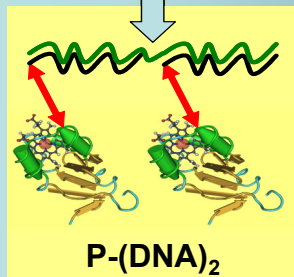
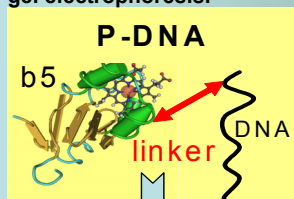
3. Département LPMO, Institut FEMTO-ST, UMR 6174 CNRS, Besançon, France

AIM: We present an original biochip based on nano-bio-assemblies onto gold substrates. Various engineering processes are performed to build macromolecular Legos including molecular biology and molecular grafting techniques leading to the realization of new generation of self-assembled DNA chip. Characterizations of thin biomolecular films are performed through Atomic Force Microscopy (AFM) and Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments. This biochip is conceived to improve the understanding of the DNA-Protein interaction mechanisms in a bio-mimetic environment.

Realization and Characterization of the Biochip

Supra-biomolecular assemblies

A modified DNA single strand was covalently assembled to an engineered protein (cytochrome b5) through an hetero bifunctional linker (SPDP) to give unique hybrid molecular species (P-DNA). Two monomers can be bridged by hybridization with complementary DNA to give dimeric species (P-DNA)₂. But monomer/complementary DNA ratio modified hybridization processes and produced different species which were purified by gel filtration and analysed by non-denaturing gel electrophoresis.



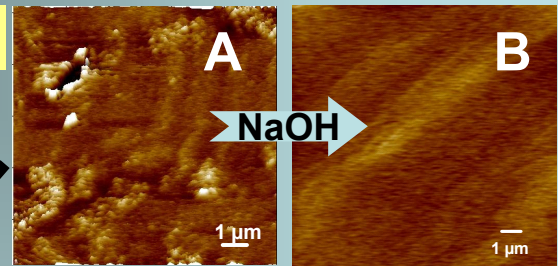
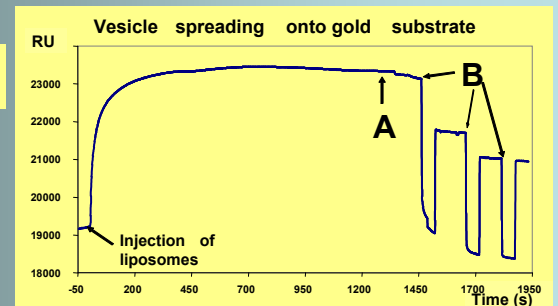
SPR

AFM

Non-denaturing gel electrophoresis

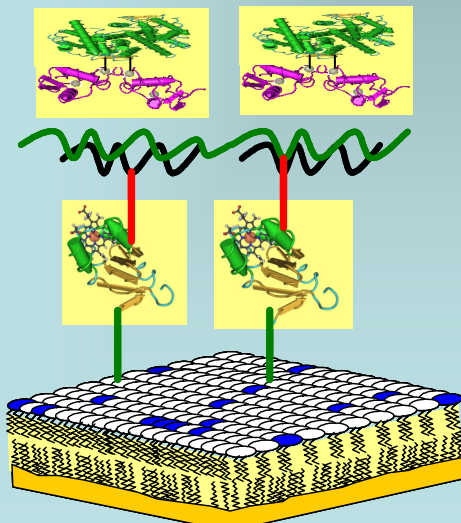
Hybrid Bilayer

Gold surface was chemically functionalized by Octa-decyl-mercaptan giving hydrophobic properties to the biochip. Lipidic vesicles spread spontaneously onto the functionalized surface. This fusion was monitored in real time by SPR using Biacore® technology as indicated on the sensorgram and topography of the resulting biomolecular film was characterized by AFM.



Biomolecular engineering

Toward a dynamic DNA Network



ER

ERE

b5

HB

(P-DNA)₂ species bind strongly to the hybrid bilayer through metallic ion affinity with a surfacic density reaching 1 pmole.cm⁻² (i.e up than 10⁵ DNA probes per μm²)

Hybrid bilayer (HB) conferred bio-mimetism to the sensor by isolating biomolecules from the metallic substrate.

This DNA network presented low structural and steric hindrances allowing to study interactions between a specific DNA sequence named Estrogen Response Element (ERE) and the Estrogen Receptor (ER).

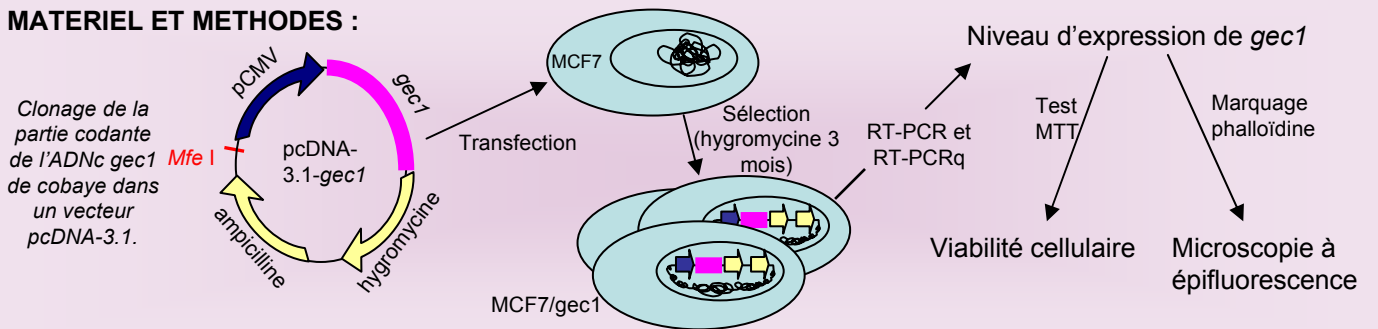
PROSPECTS : This versatile biochip allows to manage the sensitivity and the specificity for particular bio-applications. Especially, we want to develop a generic platform to study the mechanism of transcription factor interactions with DNA and to screen several drugs.

Effet de la surexpression de *gec1* sur le phénotype et le potentiel prolifératif de cellules de cancer du sein

Berthier A., Tolle F., Mansuy-Schlick V., Fraichard A., Delage-Mourroux R., Jouvenot M.

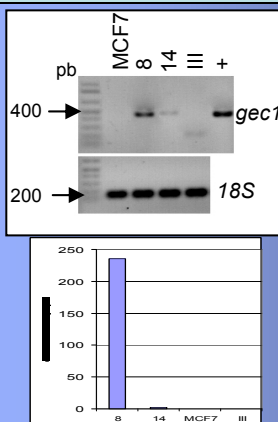
INTRODUCTION : Le gène estrogéno-dépendant *gec1* code une protéine de 117 acides aminés qui interagit avec des protéines du cytosquelette. L'expression de *gec1* est très faible dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Une perte d'expression de *gec1* pourrait donc être liée à l'hyperprolifération cellulaire. Il apparaît donc important d'étudier l'implication potentielle de *gec1* dans la prolifération et le processus de cancérisation.

MATERIEL ET METHODES :



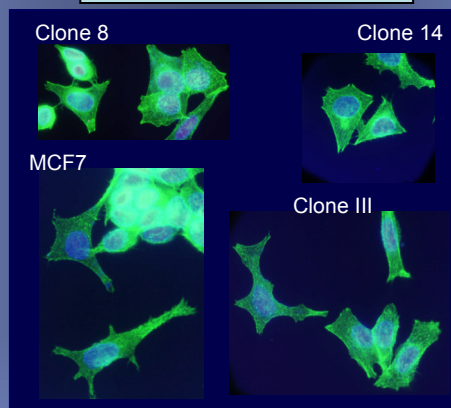
RESULTATS

Expression de *gec1*



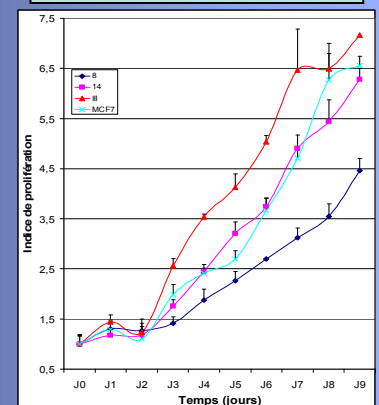
Les MCF7 n'expriment pas *gec1*, le clone 8 surexprime *gec1* alors que le clone 14 ne l'exprime que faiblement. Le clone III correspond au vecteur pcDNA-3.1 vide.

Marquage de l'actine



Les cellules MCF7 et le clone III ont une morphologie similaire avec de longs prolongements cellulaires. Les clones exprimant GEC1 présentent un aspect étoilé différent des contrôles. Par contre, aucune modification du réseau d'actine entre les différents clones n'est observée.

Viabilité cellulaire



Une surexpression de GEC1 (clone 8) engendre une réduction de la prolifération cellulaire.

CONCLUSION :

La surexpression de GEC1 dans la lignée stable MCF7/*gec1* engendre des modifications morphologiques des cellules ainsi qu'une diminution de la prolifération par rapport aux cellules contrôles « sauvages » ou transfectées par un vecteur vide. Cependant, ces modifications phénotypiques ne semblent pas être liées à une perturbation du réseau d'actine. Il apparaît nécessaire d'étudier l'impact de GEC1 sur les autres protéines du cytosquelette. Connaissant l'effet de GEC1 sur la prolifération, nous évaluerons le pouvoir tumorigène de ces lignées stables MCF7/*gec1* en étudiant leurs développements d'une part sur agar mou et d'autre part, *in vivo*, par injection à des souris nude.

Effect of chrysin and 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin from *Podocytisus caramanicus* on ER α transactivation.

Alexandre Berthier¹, Corinne Girard², Aurélie Grandvilllemin², Frédéric Muyard², Alexios-Leandros Skaltsounis³, Michèle Jouvenot¹ and Régis Delage-Mourroux¹



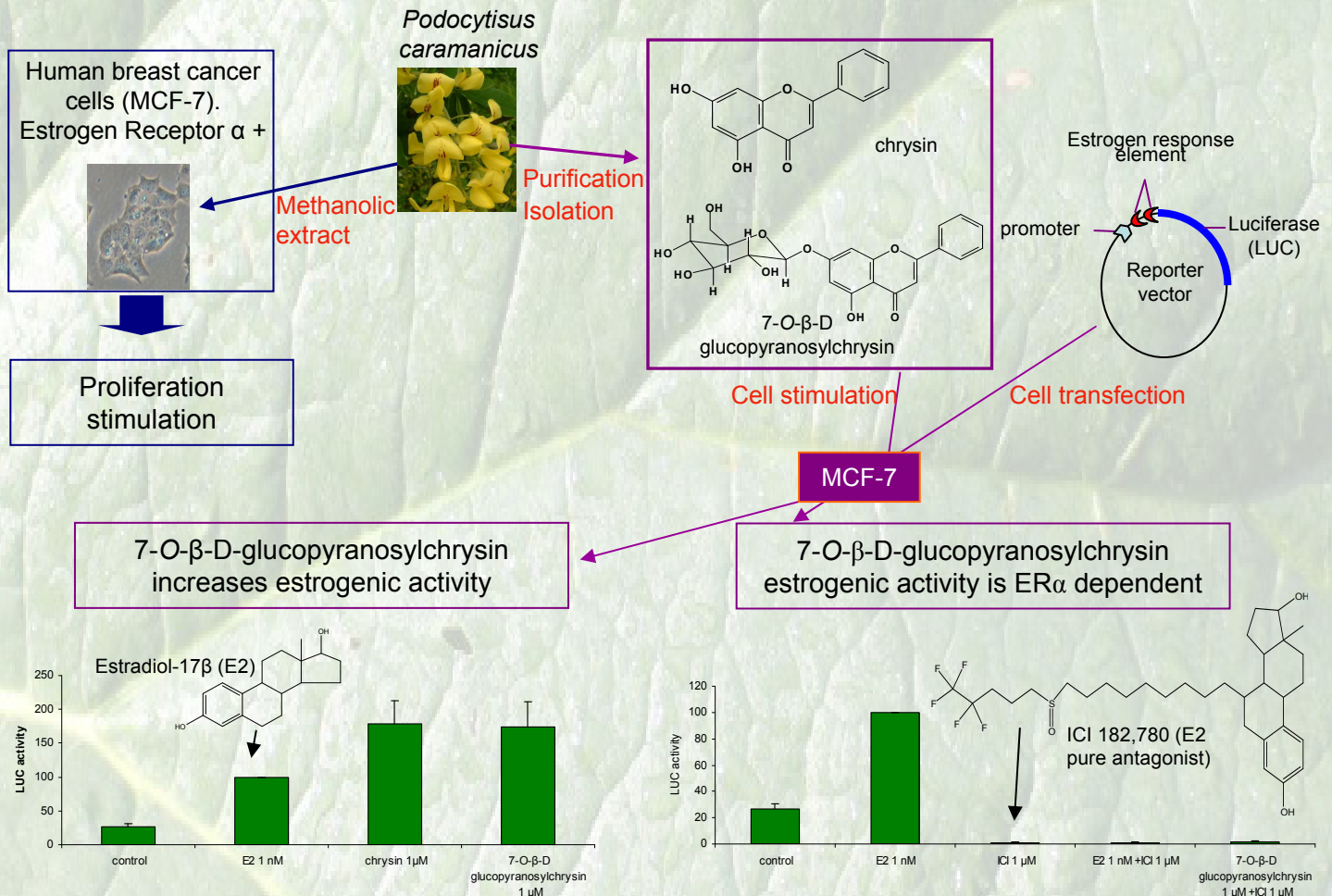
1. EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, Besançon

2. Laboratoire de Pharmacognosie, EA 3921 "Optimisation Métabolique et Cellulaire", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Besançon



3. Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece

Menopause is a gradually natural process resulting from a decrease of estrogen production and generating different physiological dysfunctions. The hormonal replacement treatment (HRT) using synthetic or natural hormones reduces development of these dysfunctions but is also associated with a higher risk of developing breast or endometrial cancer. Phytoestrogens, present estrogen-like chemical structure and could be an alternative strategy to HRT. *Fabaceae* constitute a plant family well known to produce this kind of molecules.



We isolated from *Podocytisus caramanicus* the widely distributed flavone chrysin and its glucosylated derivative 7-O- β -D-glucopyranosylchrysin. These molecules were able to increase estrogen receptor α transcriptional activity in MCF-7 cells. Our results suggest that phytochemical studies of plants remain a promising first step towards the identification of new estrogenic ligands to find alternative estrogenic compounds to estradiol.

¹EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, Besançon

²Laboratoire de Pharmacognosie, EA 3921 "Optimisation Métabolique et Cellulaire", IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Besançon

³Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece

Les estrogènes et en particulier l'estradiol-17 β (E₂) modulent, *via* leurs récepteurs, l'expression de gènes cibles, contribuant ainsi au contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires. La ménopause est un processus naturel résultant d'un arrêt de production de E₂ engendrant des dysfonctionnements physiologiques (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale...) et une augmentation des risques de maladies osseuses, cardiovasculaires et neurodégénératives. La stratégie thérapeutique adoptée consiste à remplacer l'E₂ endogène par un traitement à l'aide d'hormones synthétiques ou naturelles. Cependant, cette thérapeutique très efficace à court terme présenterait à long terme des effets indésirables comme le développement de cancers hormono-dépendants (sein, utérus). Ce traitement est donc remis en question, c'est pourquoi il apparaît nécessaire de trouver de nouvelles molécules capables de produire des effets bénéfiques au niveau de certains tissus (cerveau, os), sans produire d'effets néfastes dans d'autres (sein, utérus). Il existe, dans le monde végétal, des substances appelées phyto-estrogènes qui présentent une structure chimique proche de celle de E₂. Ces phyto-estrogènes diminueraient les troubles liés à la ménopause tout en jouant un rôle protecteur par diminution du risque de certains cancers hormono-dépendants (sein, utérus). L'objectif de cette étude est d'identifier des molécules naturelles présentant une activité estrogénique et donc ayant un intérêt pour le traitement de la ménopause.

